



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

**EFEITO ANTIOXIDANTE DA SEIVA DE *Hymenaea courbaril* L (JATOBÁ) NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS**

RUTH SILVA LIMA DA COSTA

RIO BRANCO

2018

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

**EFEITO ANTIOXIDANTE DA SEIVA DE *Hymenaea courbaril* L (JATOBÁ) NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS**

RUTH SILVA LIMA DA COSTA

Orientador: Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva

Co-orientador: Prof^a. Ph.D. Ana Flavia Marçal Pessoa

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Acre
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde na Amazônia
Occidental.

RIO BRANCO

2018

C837e Costa, Ruth Silva Lima da, 1976-
Efeito antioxidante da seiva de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) na cicatrização de feridas em camundongos / Ruth Silva Lima da Costa. – 2018.

76 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental. Rio Branco, 2018.

Inclui referências bibliográficas e anexos.

Orientador: Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva.

Coorientador: Profª. Ph.D. Ana Flavia Marçal Pessoa.

1. Ciências da saúde – Dissertação. 2. Plantas medicinais - Jatobá. 3. Cicatrização de feridas. I. Título.

CDD: 610

Bibliotecária: Alanna Santos Figueiredo – CRB-11: 1003.

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

**EFEITO ANTIOXIDANTE DA SEIVA DE *Hymenaea courbaril* L (JATOBÁ) NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS**

ALUNA: RUTH SILVA LIMA DA COSTA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva (Orientador)

Universidade Federal do Acre - UFAC

Examinadores: Prof^a. Ph.D. Ana Flavia Marçal Pessoa

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo-ICB/ USP

Prof^o Dr. Mário da Silva Garrote Filho

Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Suplente: Prof^o Dr. Miguel Júnior Sordi Bortolini

Universidade Federal do Acre - UFAC

RIO BRANCO

Apresentação Pública: 23/ 04 /2018

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas MECs para o formato da
Dissertação foram contempladas

Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva

DEDICATÓRIA

À Deus, por esquecendo-se das minhas fraquezas e limitações, fez de mim instrumento de Seu projeto para a humanidade, por me dar a honra e o prazer de desvendar um pouquinho do Seu mistério e de Sua grandeza, e encontrá-Lo na Ciência.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** embora não exista palavras para agradecer pelo seu cuidado e a oportunidade dada por Ele de realizar os meus sonhos.

Ao meu o esposo **Joseney Cordeiro da Costa**, meu companheiro, pelo privilégio de desfrutar minha vida com ele, por todo apoio, amor, palavras de incentivo e por ter cuidado de tudo, enquanto eu me dedicava ao mestrado. Eu amo você todos os dias.

Aos meus filhos amados **Nickolas Lima, Nickole Lima, Leonardo Neto, Maria Fernanda Costa** e **Isaac Costa** fonte de expiração para que eu continuasse, mesmo quando eu pensei em desistir. A eles todo o meu amor e gratidão por serem a família com a qual eu sempre sonhei.

Aos meus pais **Oséas Lima e Idelzuite Silva** que sempre foram o meu porto seguro. Obrigada por serem meu espelho e por todo apoio, dedicação, compreensão e amor e por sempre terem feito todos os esforços sem hesitar em nenhum momento, para permitir minhas conquistas.

Aos meus Irmão **Émerson Lima, Éneas Lima e Ageu Lima**, sem eles certamente minha vida seria incompleta. Obrigada por todas as palavras de apoio e incentivo, principalmente ao meu irmão **Émerson** que me inspirou a realizar esse trabalho e não mediu esforços para me ajudar em todos os momentos em que precisei. Você foi essencial para mim.

A **Ana Flavia Marçal Pessoa**, mais que uma orientadora, uma amiga que a vida me deu para sempre. Não seria capaz de retribuir tanta dedicação e apoio durante a construção desse trabalho.

Ao meu orientador Romeu **Paulo Martins da Silva** por ter me aceito como orientanda, pois sem ele eu certamente não estaria aqui. Obrigada pela confiança em mim e pela condução do meu crescimento intelectual.

Aos meus alunos de Iniciação Científica **David Smangoszevsk e Laan Diego** , sem vocês eu certamente não teria conseguido. Vocês vão longe!

A **Ana Caroline Vasconcelos** Secretária do Programa de Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental pelo auxílio e por sempre ser muito solícita as questões administrativas.

À **Universidade Federal do Amazonas e Universidade de São Paulo** por terem abertos as portas para mim para a realização desse trabalho.

*A glória de Deus está nas coisas encobertas, mas
a honra do homem, em descobri-las"*

Provérbios 25:2

SUMÁRIO

I. APRESENTAÇÃO	12
II. INTRODUÇÃO	13
III. OBJETIVO GERAL	17
III.1 Objetivos Específicos	17
IV. ARTIGO CIENTÍFICO	18
VI. REFERÊNCIAS	54
VII. ANEXOS	59
VII.1-Normas da Revista Wound Repair and Regeneration.....	59
VII.2-Autorização do Comitê de Ética no uso de Animais	75
VII.3 Comprovante de Submissão do Artigo Científico.....	76

RESUMO

A utilização de produtos naturais com ação cicatrizante é uma prática cultural comum na região amazônica, contudo pouco explorada cientificamente. A realização de estudos científicos é necessária para comprovação da eficácia e segurança desses produtos naturais. Avaliamos o efeito antioxidante de um extrato da seiva de *Hymenaea courbaril* L (jatobá) *in vitro* e *in vivo* e sua contribuição para a cicatrização de feridas em camundongos. O potencial antioxidante do extrato foi estudado usando os testes DPPH, ABTS, radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), teor de fenóis e flavonóides e ensaio de proliferação, viabilidade e migração celular. Os testes *in vivo* foram realizados em camundongos *Swiss*, adultos, submetidos a uma lesão no dorso e tratados com uma formulação contendo o extrato da seiva a 2% extraído com acetato de etila. Os animais foram tratados topicamente por 14 dias. Os resultados demonstraram que o extrato da seiva possui significativa atividade antioxidante, inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), no ensaio celular apresentou potencial para a proliferação de fibroblastos e promoveu a migração destas células. No ensaio *in vivo* a análise morfométrica do fechamento da lesão no 3º dia, sugeriu que os animais tratados com a seiva do jatobá apresentaram menor área de lesão quando comparados ao grupo controle. Quanto a avaliação da celularidade no 3º dia pós-lesão foi sugestivo que o número de células encontrava-se menor no grupo tratado. No 14º dia não houve diferença na celularidade entre os grupos. O fechamento total das lesões não ocorreu ao longo dos 14 dias de tratamento, mas por meio da avaliação histológica observou-se que houve a reepitalização. Os resultados sugerem que o extrato da seiva de jatobá apresenta potencial para a indução da cicatrização de feridas cutâneas o que pode ser induzido, entre outras propriedades pela sua atividade antioxidante.

Palavras chave: Jatobá; plantas medicinais; citotoxicidade; antioxidante; ferida.

ABSTRACT

The use of natural products with healing action is a common cultural practice in the Amazon region, however, little explored scientifically. Scientific studies are needed to prove the effectiveness and safety of these natural products. It was evaluated the antioxidant effect of an extract of the sap of *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá) *in vitro* and *in vivo* and its contribution to the healing of wounds in mice. The antioxidant potential of the extract was studied using the DPPH, ABTS tests, superoxide anion radical (O₂⁻), content of phenols and flavonoids and proliferation assay, viability and cell migration. The *in vivo* tests have been conducted in swiss mice, adults, subjected to an injury on the back and treated with a formulation containing 2% of sap extract which was extracted with ethyl acetate. The animals were treated topically for 14 days. The results have demonstrated that the sap extract has significant antioxidant activity, inhibiting the production of reactive oxygen species (ROS). In the cell assay, the extract showed potential for proliferation of fibroblasts and promoted the migration of these cells. In *in vivo* assay the morphometric analysis of closing of the injury on the third day, it was suggested that the animals treated with the jatobá sap showed reduced lesion area compared to the control group. As the assessment of cellularity in 3rd day post-injury, the result was suggestive that the number of cells was lower in the 3rd day in the treated group. On the 14th there was no difference between the groups. The total closure of the injuries did not occur during the 14-day experiment, but by means of histological evaluation, it was showed that there was a reepitalização. The results suggest that the extract from the of jatobá sap presents potential for inducing the healing of skin wounds which may be induced, among other properties, for its antioxidant activity.

Keywords: Jatobá; medicines plants; cytotoxicity; antioxidant; wound

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	2,2- azobis amidinopropano
ABTS	Radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CEUA	Comitê de Ética e Pesquisa em Animais
CJ	Controle Jatobá
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CV	Controle Veiculo
DCFH-DA	2'7'-dicloro-fluoresceína-diacetato
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
H&E	Hematoxilina/Eosina
NIH	Image J
PBS	Tampão fosfato salino
TJ	Tratamento Jatobá

I. APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada com uma introdução na qual foi explanado o potencial das plantas medicinais para uso pela assistência farmacêutica nas lesões cutâneas. Na sequência é apresentado o objetivo do estudo, seguido de um artigo científico que será submetido a revista *Wound Repair and Regeneration*. Esse artigo já foi escrito obedecendo as diretrizes para os autores, que estão em anexo desta dissertação. Após o artigo são apresentados as referências bibliográficas e os anexos.

II- INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o ser humano vem utilizando e modificando os recursos naturais disponíveis na natureza em seu próprio benefício. Com isso houve a descoberta de propriedades curativas e tóxicas das plantas que os rodeavam, utilizadas na cura e alívio de enfermidades por meio da ingestão, infusão e uso tópico^{1,2}.

As plantas medicinais são comumente utilizadas em comunidades tradicionais como medicamentos caseiros³. Representam a principal matéria prima médica utilizada pelas chamadas medicinas tradicionais em suas práticas terapêuticas, sendo a medicina popular a que utiliza o maior número de espécies diferentes, para diversos tipos de tratamento⁴.

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse pelo uso de plantas medicinais e dos respectivos extratos na terapêutica, para fins de auxílio aos cuidados primários de saúde e um complemento terapêutico, compatível com a medicina convencional. Para isso, deve haver garantia de segurança em relação a efeitos tóxicos e conhecimentos sobre efeitos secundários, interações, contraindicações, mutagenicidade, dentre outros. Além da comprovação por meio de ensaios farmacológicos e clínicos que demonstrem eficácia e a segurança planta medicinais das das mesmas o seu uso seguro⁵.

Entre os principais fatores relacionados ao uso de plantas medicinais por grande parte da população, estão os altos custos dos medicamentos industrializados, a falta de acesso da população às assistências médica e farmacêutica e à tendência atual dos consumidores em utilizar produtos de origem natural⁶.

O uso de plantas medicinais para fins curativos iniciou-se de forma empírica. No entanto, com o avanço da ciência, houve mapeamento de sua composição química e a descoberta de novas moléculas bioativas para o seu uso com segurança⁷.

Nos últimos anos, o Brasil faturou cerca de 8 bilhões por meio da indústria farmacêutica. Destes, estima-se que 25% foram resultantes de novos medicamentos derivados de plantas e sendo que uma parte significativa da população que vive no Brasil, principalmente na região amazônica, depende principalmente ou mesmo exclusivamente da utilização de plantas medicinais para os cuidados essenciais de

saúde. No entanto, na maioria das vezes, o potencial dessas plantas ainda não foi devidamente explorado cientificamente. Por exemplo, apenas 8% das espécies vegetais brasileiras foram estudadas até então em busca de moléculas bioativas ⁸.

Ainda há o fato de que seu uso pode trazer riscos à saúde. Por isso é muito importante a investigação da atividade farmacológica e toxicológica desses produtos para estabelecer sua real eficácia e segurança ⁹.

Dentre as inúmeras riquezas naturais do Brasil, encontra-se o *Hymenaea courbaril* L., popularmente conhecido como jatobá. O gênero *Hymenaea* compreende 14 espécies distribuídas desde o México até a América do Sul, podendo ser encontrada também na costa leste da África. Dentre essas espécies, 12 são encontradas no Brasil ¹⁰ e sua distribuição se estende por todas as regiões geográficas, especialmente na Amazônia, onde é encontrado nas matas de terra firme de solo argiloso, e algumas vezes em várzeas altas.¹¹

A maioria das espécies do gênero *Hymenae* possui algum tipo de valor econômico, como madeira, resina e fruto comestível, além de possuir variados usos na medicina popular ^{12,13}.

Durante séculos, a espécie tem sido utilizada para fins culinários e na medicina popular brasileira para o tratamento de artrite, disfunção gástrica e doenças respiratórias, como também para o tratamento de processos inflamatórios ¹⁴, infecções bacterianas ¹⁵, reumatismos ¹⁶ e anemias ¹⁷. Há até mesmo registro de uso da folha para o controle biológico de insetos que atacam plantas ¹⁸. Também é popularmente amplamente utilizada no tratamento de gripe, bronquite, verminose, no tratamento de câncer de próstata, dores no estômago e como cicatrizante ^{19,20}.

Estudo realizado por Pinto, Guedes e Chisto demonstrou uma multiplicidade de formas de usos populares de partes da planta como a seiva, a folha e a casca. De acordo com esse estudo, a seiva pode ser ingerida na sua forma pura, enquanto a casca pode ser utilizada por meio de chá. Já as folhas podem ser engarrafadas e até mesmo misturadas a outras plantas ²¹.

Análises fitoquímicas de *Hymenaea courbaril* L revelaram a presença de compostos fenólicos, tais como taninos, flavonóides, óleos essenciais e terpenos na resina produzida pelo tronco, bem como nos extratos da casca, folhas, frutos, além da presença diterpenos na resina exsudada pelo tronco e em extratos da casca ²²⁻²⁵. Quanto à ação biológica, foram descritas atividades anti-inflamatórias, miorelaxantes, inibidora da peroxidação lipídica e ação antioxidante ^{26,27}.

Dessa forma, as plantas medicinais vem sendo uma alternativa eficaz para o tratamento de inúmeras patologias, dentre elas as feridas cutâneas que afetam significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Essas feridas também são consideradas como uma das principais causas de incapacidades físicas ²⁸. Independente da sua etiologia, tais feridas podem ser consideradas um grave problema de saúde pública, pois estão relacionadas à significativos índices de morbimortalidade ²⁹.

A ferida cutânea pode ser definida como qualquer ruptura da integridade da pele, que pode apresentar diferentes tamanhos, formas, dimensões e profundidades, podendo ser ocasionado por razões distintas ³⁰. Além disso, provocam considerável impacto no bem-estar de indivíduos que as possuem, pois podem ocasionar dor, imobilidade, incapacidades, alterações psicoemocionais relacionadas à autoestima e à autoimagem, mudanças sociais advindas de hospitalizações e afastamento do convívio social ³¹⁻³³.

Nesse sentido, para a sobrevivência do ser humano, o processo de cicatrização configura-se como fundamental, pois representa um mecanismo sofisticado de defesa e renovação do organismo ³⁴.

A cicatrização é um processo complexo que envolve alterações bioquímicas e fisiológicas, pois consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos que culminam com a reconstituição tecidual, comum em todas as feridas, independentemente do agente que a causou, é um processo sistêmico e dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais em que o organismo se encontra ³⁵.

O processo de cicatrização envolve três fases que se sobrepõem no tempo e espaço, sendo denominadas como fase de inflamação, fase proliferativa e fase de maturação ou de remodelamento da derme, que ocorre com o objetivo de restabelecer o tecido após o trauma ³⁶⁻⁴⁴.

A primeira etapa da cicatrização inicia-se com a fase inflamatória, que ocorre nas primeiras doze horas após a lesão. Logo que ocorre o ferimento, há um extravasamento sanguíneo, que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares como as plaquetas formando um tampão no local, rico em fibrina. Esse processo é seguido de vasoconstrição e ativação de plaquetas que ativam a cascata de coagulação. Isso inicia a formação de uma matriz de fibrina, permitindo a migração celular, que é iniciada por neutrófilos, que destroem microorganismos invasores e,

juntamente com os macrófagos, produzem fatores de crescimento que estimulam a angiogênese e a fibrinogênese. Com a proliferação e migração celular há o início de cobertura da lesão ^{45,46}.

A segunda fase, chamada de proliferativa, dura cerca de três a quatro dias, e é a responsável pelo fechamento da lesão e abrange a reepitelização. A fibroplasia e angiogênese que compõem o chamado tecido de granulação ocorre quatro dias após a lesão, o tecido lesionado. Os fibroblastos produzem uma nova matriz extracelular necessária para o crescimento celular. Novos vasos sanguíneos carregam o oxigênio e nutrientes para o metabolismo celular local. Assim, a proliferação e a regeneração levam à formação da cicatriz e reparo do tecido lesionado, que acontecem após o fenômeno vascular e exsudativo da inflamação ⁴⁷.

A terceira fase da cicatrização é a maturação ou remodelamento e ocorre após 14 dias do início da lesão. Nela ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. A ferida se torna menos celular e muitos capilares são ocluídos e, eventualmente, desaparecem. O tecido de granulação torna-se, gradualmente, uma cicatriz densa e relativamente avascular, consistindo de fibras de colágeno organizadas junto às linhas de tensão com fibroblastos relativamente inativos^{48, 49}. Nessa fase é onde acontece a remodelagem do ferimento e ocorre a conversão do tecido cicatricial inicial em tecido cicatricial – consolidação e maturação. Ela dura até um ano ou mais. Ao final, a relação entre o colágeno I e III atinge proporção semelhante a anterior à ferida ^{50, 51}.

No *diabetes mellitus* ou na exposição excessiva à radiação, situações em que ocorre diminuição da resposta do organismo, formam-se úlceras decorrentes de falha no processo de cicatrização ⁵². Assim, é de grande utilidade a busca de novos compostos que possam acelerar esse processo, especialmente em doenças em que a cicatrização ocorre de forma mais demorada, como no diabetes ⁵³.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e estudar as atividades antioxidantes e cicatrizantes do extrato da seiva de *Hymenaea courbaril L*, e assim buscar encontrar novas evidências de atividade biológica da espécie no processo de cicatrização.

III. OBJETIVO GERAL

Estudar as atividades antioxidantes e cicatrizantes de um extrato da seiva de *Hymenaea courbaril L (Jatobá)*.

III. Objetivos Específicos

- Obter extrato ativo e caracterizar a sua composição química;
- Conhecer o perfil antioxidante do extrato;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade e o efeito sobre a proliferação celular;
- Analisar o potencial cicatrizante do extrato em camundongos.

IV ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito antioxidante da seiva de *Hymenaea courbaril* L (jatobá) na cicatrização de feridas em camundongos

Ruth Silva Lima da Costa¹ M.Sc, David Smangoszevski Martins¹; Laan Diego Carvalho Peixoto ¹; Marília Seelaender² Ph.D; Bárbara Janaína Paula da Silva³, Larissa Barbosa Borges³, Emerson Silva Lima Dr.³ Hector Henrique Ferreira Koolen Dr.⁴ Ana Flávia Marçal Pessoa Ph.D²; Romeu Paulo Martins Silva Dr.¹

¹ Programa de Pós-Graduação em ciências da saúde na Amazônia Ocidental, Universidade Federal do Acre – UFAC, Rio Branco – Ac, Brasil

² Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP – ICB/USP, São Paulo – SP, Brasil

³ Laboratório de Atividade Biológica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas- UFAM, Manaus – AM, Brasil.

⁴ Programa de Mestrado em Biotecnologia, Universidade do Estado do Amazonas-UEA, Manaus – AM, Brasil.

Título Curto: *Hymenaea courbaril* L (Jatobá) modula o processo de cicatrização em camundongos.

Palavras chave: Jatobá; *Hymenaea courbaril* L; citotoxicidade; antioxidante; ferida.

*Correspondência para

Ruth Silva Lima da Costa

Programa de Pós-Graduação em ciências da saúde na Amazônia Ocidental

Universidade Federal do Acre

Rua dos Antúrios, 651, 69901-212

Rio Branco – Acre, Brasil.

Telefone: 55-68-3229 1570

Fax: 55-11-68-99960 2723

E-mail:ruttylyma@gmail.com

RESUMO

A utilização de produtos naturais com ação cicatrizante é uma prática cultural comum na região amazônica do Brasil, contudo pouco explorada cientificamente. A realização de estudos científicos é necessária para comprovação da eficácia e segurança desses produtos naturais. Avaliamos o efeito antioxidante de um extrato da seiva de *Hymenaea courbaril* L (jatobá) *in vitro* e *in vivo* e sua contribuição para a cicatrização de feridas em camundongos. O potencial antioxidante do extrato foi estudado usando os testes DPPH, ABTS, radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), teor de fenóis e flavonóides e ensaios de proliferação, viabilidade e migração celular. Os testes *in vivo* foram realizados em camundongos Swiss, adultos, submetidos a uma lesão no dorso e tratados com uma formulação contendo o extrato da seiva a 2% extraído com acetato de etila. Os animais foram tratados topicamente por 14 dias. O extrato da seiva possui significativa atividade antioxidante, inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), no ensaio celular apresentou potencial de proliferação de fibroblastos e promoveu a migração destas células. No ensaio *in vivo* a análise morfométrica do fechamento da lesão no 3º dia, sugeriu que os animais tratados com a seiva do jatobá apresentaram menor área de lesão quando comparados ao grupo controle. Quanto a avaliação da celularidade no 3º dia pós-lesão foi sugestivo que o número de células se encontrava menor no 3º dia no grupo tratado. No 14º dia não houve diferença entre os grupos. O fechamento total das lesões não ocorreu ao longo dos 14 dias de experimento, mas por meio da avaliação histológica observou-se que houve a reepitalização. Os resultados sugerem que o extrato da seiva de jatobá apresenta potencial para a indução da cicatrização de feridas cutâneas o que pode ser induzido pela sua atividade antioxidante.

ABSTRACT

The use of natural products with healing action is a common cultural practice in the in the Brazilian Amazon region, however, little explored scientifically. Scientific studies are needed to prove the effectiveness and safety of these natural products. It was evaluated the antioxidant effect of an extract of the sap of *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá) in vitro and in vivo and its contribution to the healing of wounds in mice. The antioxidant potential of the extract was studied using the DPPH, ABTS tests, superoxide anion radical (O₂⁻), content of phenols and flavonoids and proliferation assay, viability and cell migration. The in vivo tests have been conducted in swiss mice, adults, subjected to an injury on the back and treated with a formulation containing 2% of sap extract which was extracted with ethyl acetate. The animals were treated topically for 14 days. The results have demonstrated that the sap extract has significant antioxidant activity, inhibiting the production of reactive oxygen species (ROS). In the cell assay, the extract showed potential for proliferation of fibroblasts and promoted the migration of these cells. In in vivo assay the morphometric analysis of closing of the injury on the third day, it was suggested that the animals treated with the Jatobá sap showed reduced lesion area compared to the control group. As the assessment of cellularity in 3rd day post-injury, the result was suggestive that the number of cells was lower in the 3rd day in the treated group. On the 14th there was no difference between the groups. The total closure of the injuries did not occur during the 14-day experiment, but by means of histological evaluation, it was showed that there was a reepithelization. The results suggest that the extract from the of Jatobá sap presents potential for inducing the healing of skin wounds which may be induced, for its antioxidant activity.

INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo complexo que envolve alterações bioquímicas e fisiológicas que culminam com a reestruturação tecidual, comum a todas as feridas, independentemente do agente que a causou. Esse processo também está diretamente relacionado às condições gerais em que o organismo se encontra ¹. Atualmente a utilização de vitaminas antioxidantes ², alimentos funcionais ³, proteínas ⁴ e plantas medicinais ⁵ na cicatrização de feridas é amplamente estudada. Dentre esses, destacam-se as plantas medicinais, que vem sendo objeto de inúmeras pesquisas e tem se tornado uma alternativa eficaz para o tratamento de várias patologias. Tais patologias incluem feridas cutâneas que afetam a qualidade de vida dos pacientes e são consideradas como uma das principais causas de incapacidades físicas ⁶.

Dentre as inúmeras riquezas naturais do Brasil encontra-se o *Hymenaea courbaril* L., popularmente conhecido como jatobá, que pertence à família *Fabaceae* e à subfamília *Caesalpinioideae*. Essa árvore ocorre em todos os principais tipos de ecossistemas tropicais de baixa altitude e encontra-se bem distribuído pelo Brasil, ocorrendo em quase todas as regiões, com distribuição uniforme na Amazônia ⁷.

O jatobá apresenta diferentes tipos de uso, como madeira de excelente qualidade e frutos comestíveis. Durante séculos, tem sido utilizada para fins culinários. Já na medicina popular apresenta uma ampla utilização terapêutica⁸, sendo que folhas, raízes, frutos, resina, seiva e especialmente a casca do caule são utilizadas para diversos tipos de tratamentos populares⁹, como problemas pulmonares¹⁰, cardiovasculares, verminoses, inflamações das vias urinárias e anemias¹¹.

Diversos estudos realizados com a espécie *H. courbaril* revelaram a presença de compostos fenólicos, tais como: taninos, flavonóides, óleos essenciais, terpenos e diterpenos¹². Quanto à sua ação biológica, os estudos realizados em extratos, frações ou compostos isolados desta planta, demonstraram suas atividades antioxidantes e antiinflamatórias¹³, ação antiviral¹⁴, atividade antineoplásica, de imunossupressão¹⁵, antimicrobiana¹⁶, mio relaxante¹⁷ e a atividade antifúngica da seiva¹⁸. Entretanto, o uso da seiva do jatobá na cicatrização de feridas cutâneas ainda não fora estudado.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito antioxidante e cicatrizante em modelos *in vitro* e *in vivo* presentes no extrato da seiva de Jatobá.

MATERIAL E MÉTODOS

Drogas, reagentes, solventes e Equipamentos

O Ácido Gálico, Ácido Ascórbico, Azul de Trypan, Acetato de Etila, DMSO, DCFH-DA, Metanol, Formaldeído 4%, Hexano, Metanol, Paraplast®, solução 2,2-azobis amidinopropano, Trolox, Poly-L-Lysine e Xilol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO- USA), enquanto a Cetamina e Xilazina da Ceva (São Paulo, SP-Brasil), o Cloridrato de Doxorrubicina da Euroframa (SP-Brasil), o Isoflurano da BioChimico (Rio de Janeiro, RJ-Brasil), a Solução Balanceada de Hank's da Vitrocell, (Campinas, SP-Brasil), o Paracetamol da SEM (São Paulo, SP-Brasil) e a Quercetina é de procedência da Vetec (São Paulo, SP-Brasil).

O Evaporador Rotativo à Vácuo da marca Marconi (São Paulo, SP-Brasil). A câmera digital Sony Alpha (São Paulo, SP-Brasil). O microscópio da marca Leica – Microscope (Alemanha – DE).

Obtenção da Amostra

A amostra da seiva da espécie *H. courbaril* foi coletada na reserva extrativista Chico Mendes, após autorização do Ibama sob o nº 57286-1. Partes da planta foram coletadas para exsicata, sob as seguintes coordenadas GPS – 9°59,50,67°59,2,2ws e identificada na Escola da Floresta e depositada no herbário da Universidade Federal do Acre (UFAC) com número de tombamento UFACPZ 20025.

Obtenção do extrato seco

O resíduo utilizado para preparação do extrato foi a seiva de *H. courbaril*, a partir da qual foi obtido o extrato seco para as análises subsequentes. Brevemente 500 mL da seiva foi lavada com 500 mL de hexano em um aparato de vidro do tipo Soxhlet. Após extração a exaustão, o resíduo foi lavado com 500 mL de acetato de etila. Em seguida, o acetato de etila foi evaporado sob vácuo utilizando um rotaevaporador e o resíduo obtido foi armazenado em dessecador até o uso. O rendimento da extração foi de aproximadamente 17.5%.

Determinação do Potencial Antioxidante

O extrato foi submetido ao ensaio de varredura do Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), realizado de acordo com Brand - Willians (1995)¹⁹, com pequenas modificações para a utilização de microplacas de 96 poços.

O método baseia-se na transferência de elétrons, em que, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH, que possui cor púrpura, é reduzido, formando difenil- picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância¹⁹.

A determinação de atividade anti radical foi realizada mediante o ensaio de varredura do Radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico (ABTS), que foi baseado na metodologia descrita por Re et al. (1999)²⁰, com pequenas modificações para que o teste também fosse realizado em microplaca de 96 poços. Por meio da adição do persulfato de potássio, ocorreu a formação do radical ABTS, que apresenta cor esverdeada. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do ABTS, provocando a perda da coloração do meio reacional. Os resultados são expressos em função do padrão trolox submetido as mesmas condições de análise ²⁰.

O ensaio de varredura do Radical Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi realizado por meio do método desenvolvido por Ewing e Janero (1995)²¹, onde a atividade varredora é gerada durante o metabolismo de organismos aeróbicos, seja como produtos finais de reações enzimáticas ou acidentalmente como produtos celulares secundários de reações redoxes. Neste ensaio, o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado pelo sistema PMS-NADH (Phenazine methosulfate e Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo), reduzidos pela oxidação do Nitro Blue Tetrazolium ²¹.

A dosagem de fenóis totais foi quantificada pelo método descrito por Singleton e Rossi (1965)²². Já a mensuração de flavonóides totais foi feita mediante o método descrito por Zhishen, Mengcheng, Jianming (1999)²³, com o objetivo de avaliar o possível potencial antioxidante da amostra.

Atividade Antioxidante Celular

A avaliação da atividade antioxidante celular foi realizada utilizando a metodologia descrita por Wolfe e Liu (2007),²⁴ a qual baseia-se na detecção da produção de ROS intracelular pela utilização do composto fluorescente: 2'7'-dicloro-

fluoresceína-diacetato (DCFH-DA) da Sigma-USA.

Nesta técnica, foram utilizadas células da linhagem MRC-5 Fibroblásticas, semeadas na concentração de 6×10^4 células/poço em 100 μL de meio de crescimento e incubados por 24h. Após esse período, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, foi preparada uma solução a 25 μM de DCFH-DA dissolvido em tampão Hank's (Vitrocell-BRA) e o extrato foi adicionado juntamente com essa solução de acordo com as concentrações estabelecidas. Foram adicionados 100 μL dessa diluição aos poços da placa e foram incubados durante 60 minutos a 37°C e 5% de CO_2 .

Posteriormente, os poços foram lavados novamente com PBS, e logo em seguida foi preparada uma solução de 2,2- azobis amidinopropano (AAPH) a 600 μM dissolvida em tampão Hank's, 100 μL dessa solução foi adicionada aos poços. Em seguida foi realizada a leitura da placa com a fluorescência mensurada imediatamente no comprimento de onda de excitação 485 nm e de emissão 520 nm durante 60 minutos em intervalos de 5 min.

Os controles com e sem DCFH-DA foram preparados e submetidos a processos análogos. Quercetina (Vetec-BRA), foi utilizada como controle positivo da atividade antioxidante.

Ensaio de Citotoxicidade e Proliferação Celular

O ensaio de citotoxicidade e proliferação celular foi realizado pelo método Alamar Blue, de acordo com Nakayama (1997) ²⁶. As linhagens celulares (MRC-5), foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço (100 μL de meio DMEM com SBF 10%) em placas de 96 poços.

Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com o extrato de Jatobá nas concentrações de (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg/mL).

O experimento foi realizado em triplicata para cada período de tratamento (24h). Como controle positivo de morte, foi utilizada a Doxorrubicina (Euro Farma-BRA) nas concentrações de (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 µg/mL) e determinado o valor de CI^{50} . Para controle negativo apenas o meio de cultura com DMSO a 0,01%.

Após o período de tratamento (72 h) foi adicionado 10 µL de resazurina 0,4% (diluição 1:20). O período de incubação padronizado para as linhagens celulares descritas acima foi de 3 horas, tempo necessário para a metabolização da resazurina.

Os dados da leitura de fluorescência emitida pelas células tratadas e pelo controle (sem tratamento). O ensaio foi realizado em triplicata de amostras e experimentos.

Curva de Crescimento e Proliferação Celular

O ensaio consistiu na avaliação da curva de crescimento e proliferação celular pelo método de exclusão por Azul de Trypan (Sigma-USA), de acordo com a metodologia de Freshney (1994) ²⁵. As células de fibroblastos MRC-5 foram plaqueadas na concentração de 3×10^4 de células/mL (meio DMEM, com SBF 10%) em placas de 24 poços, mantidas em estufa a 37 °C, e 5% de CO₂. Após atingirem uma confluência celular de 80% da superfície ocupada, as células foram tratadas na concentração única não citotóxicas de cada amostra. O estudo de proliferação teve intervalos medidos em três tempos experimentais: 24, 48 e 72 h de contato com os compostos. Após tripsinização, e inativação com meio e PBS, foram utilizados 90 µL da suspensão celular que, por sua vez, fora adicionado 10 µL de azul de Trypan.

Desta suspensão celular foram transferidos 10 µL para a câmara de Neubauer e as células contadas, excluindo-se aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis). Como controle negativo, as células foram mantidas sem tratamento, contendo apenas o meio de cultura DMEM acrescido de DMSO 0,1%.

Ensaio de Migração Celular

No experimento de migração celular, segundo o método utilizado por Flora (2016)²⁷, fibroblastos MRC-5 foram plaqueados na concentração de 50×10^4 de células/mL (meio DMEM, com SBF 10%) em placas de 12 poços, mantidas em estufa a 37 °C, e 5% de CO₂. Após atingirem uma confluência celular de 100% da superfície ocupada, foi feito um risco com uma ponteira de 100µl no meio dos poços e em seguida lavados com PBS. As células foram então tratadas nas concentrações únicas não citotóxicas (12,5, 25 e 50 µg/mL).

O estudo de migração celular teve intervalos medidos em três tempos experimentais: 24, 48 e 72 h de contato com os compostos. As placas com as células tratadas foram então analisadas em microscópio óptico, para avaliação da migração celular. O registro da migração foi feito por meio da captura de imagem da placa após fotografia com câmera digital Sony Alpha NEX (modelo – DSC E18-55 24,4 2MP 3 X zoom óptico).

No controle negativo foi utilizado apenas o meio DMEM sem tratamento, enquanto no controle positivo de tratamento foi utilizado o ácido ascórbico (Sigma-USA), que induz a proliferação celular na concentração de 50 µg/ mL e o extrato da seiva de jatobá a 50 µg/ mL.

Caracterização Química do Extrato

Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta-performance com espectrometria de massas (HPLC-MS) modelo iFunnel LC-MS 6550 (Agilent Technologies) equipado com uma fonte de ionização eletrospray. A fonte operou no modo negativo de polaridade. A separação das substâncias foi realizada em uma coluna de HPLC modelo poroshell 120 EC-C18 (dimensões: 2,7 µm de partícula, 4,6 mm i.d., coluna de 50 mm (Agilent Technologies). Como fase móvel, misturas binárias de água (A) e acetonitrila (B) foram usadas. A eluição gradiente a 35 °C foi como se segue: 0-1 min, 15% B; 1 a 22 min, 15 a 100% (v/v) B; 22-25 min, 100% B a uma taxa de fluxo de 0,35 mL/min. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 15 °C e o volume de injeção foi de 15 µL. Os parâmetros de origem ESI foram os seguintes: VCap, 3500 V; voltagem do bocal, 0 V; fragmentador, 100 V; skimmer, 65 V; temperatura do gás, 280 °C; fluxo de gás 14 L/min; nebulizador 45 psi. Os espectros MS e fragmentação (MS/MS) foram adquiridos na faixa m/z de 150 a 1000. Os espectros de MS/MS foram interpretados manualmente em comparação com dados previamente publicados.

Preparação da Formulação Farmacêutica

Foi utilizado o extrato da seiva de jatobá, que se encontrava em consistência pastosa, homogeneizado diretamente em vaselina sólida (Rioquímica-BRA) com o auxílio de um almofariz e pistilo numa proporção de 2% extrato da seiva de jatobá: vaselina (p/p). A formulação foi identificada como tratamento Jatobá (TJ). Para a base foi utilizada somente a vaselina sólida pura identificada como Controle Veículo (CV).

Animais

Camundongos *Swiss* machos, com sessenta dias, foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Acre e mantidos a 22 ° C sob um ciclo claro / escuro de 12/12 h. Os animais foram alimentados com ração da marca Nuvilab e água *ad libitum*. Um total de 28 animais foram utilizados neste estudo. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais (CEUA) da Universidade Federal do Acre (protocolo nº 23/2016, nº do registro 23107.015414/2016).

Para o experimento os animais foram divididos em 2 grupos: Controle Jatobá (CJ) e Controle Veiculo (CV), cada grupo foi composto por 7 animais. O experimento foi realizado duas vezes com a mesma quantidade de animais em cada grupo totalizando ao final 28 animais, sendo que na primeira fase os animais foram acompanhados até o 3º dia para a avaliação da fase inflamatória da cicatrização e na segunda fase, eles foram acompanhados até o 14º dia para a análise da fase proliferativa.

Indução da Ferida

Para a confecção da ferida, os animais foram induzidos ao relaxamento e narcose utilizando-se mistura de Xilazina/Cetamina (Ceva-BRA), sendo 40 mg/kg de peso cada, por via intraperitoneal. A confecção da ferida foi realizada no dorso dos animais após tricotomia, com auxílio de um molde 1 cm² de diâmetro, vazado no centro. Utilizando-se o molde e uma caneta porosa foi feita uma marcação na pele; a área demarcada (1 cm²) foi removida cirurgicamente utilizando-se pinça dente de rato e tesoura pequena de ponta fina. Em seguida os animais foram colocados em gaiolas

individuais (7,5 x 12 cm) e aquecidos (sob luz, com proteção ocular) para evitar hipotermia. Os animais receberam uma dose do analgésico paracetamol (75 mg/kg de peso), após a cirurgia. Os animais permaneceram em gaiolas individuais ao longo dos experimentos ².

Tratamento Tópico

Os animais foram divididos em dois grupos que receberam os seguintes tratamentos na área da ferida: grupo Controle Veículo (CV), que recebeu apenas o veículo da pomada, e o grupo Controle Jatobá (CJ), que recebeu a pomada contendo o extrato da seiva do Jatobá. Os tratamentos iniciaram-se no dia zero da lesão, seguindo-se até o 3º dia para o primeiro grupo e até 14º dia pós-lesão para o segundo grupo, sempre às 17 horas. Foi padronizada a quantidade de 200 µl da pomada medidos em micropipeta, à aplicação tópica.

Retirada da pele, fixação e processamento do tecido

Para a retirada da pele os animais foram sedados utilizando-se mistura de Xilazina/Cetamina (40 mg/kg de peso cada), a seguir a pele removida com auxílio de tesoura cirúrgica de ponta fina e pinça dente de rato e foi posicionada em pedaços de cortiça e fixada em formaldeído 4% (Sigma - USA) por 8 horas, à temperatura de 8 °C. Após o procedimento os animais foram submetidos a eutanásia através da dose letal de Xilazina/Cetamina.

As amostras da pele foram desidratadas e diafanizadas em baterias de etanol da Sigma-USA (70%, 95% e 100%) e de Xilol (I e II) (Sigma-USA), cada passagem com 1 hora de duração, e incluídas em Paraplast®(Sigma-USA). Cortes com 7 µm de

espessura foram obtidos em micrótomo rotatório manual (820 Spencer Microtome) e estendidos sobre lâminas previamente cobertas com Poly – L - Lysine (Sigma-USA) ².

Medição da área ferida

A região da ferida foi fotografada imediatamente após a ferida (dia zero) e após 1, 3, 7, 10,12 e 14 dias, com câmera digital Sony Alpha NEX (modelo – DSC E18-55 24,4 2MP 3 X zoom óptico) a uma distância fixa de 20 cm. A área das feridas foi medida utilizando-se o programa Image J (NIH). Para capturar as imagens os animais foram submetidos a narcose com isoflurano (BioChimico -BRA). Os resultados foram expressos como porcentagem (%) da área original da ferida. ²

Análise Histológica e Contagem de Células

A análise histológica foi realizada após coloração com Hematoxilina/Eosina (H&E), em microscópio, Leica – Microscope. Para as fotomicrografias foi utilizada câmera Leica DMC2990. A medida da celularidade das micrografias coradas com H&E foi realizada utilizando-se o programa Image J para medir a quantidade da cor azul (RGB-Red Blue and Green), coloração observada no núcleo das células, via medida do histograma.

Análise Estatística

As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando ANOVA *one way* e para testes não paramétricos, utilizou-se o Kruskal-Wallis. O Software utilizado para a análise de dados foi o GraphPad Prism. O significado foi definido em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Determinação da Capacidade antioxidante in vitro

A Tabela 1 evidencia que a amostra do extrato em acetato de etila da seiva de Jatobá, mediante os testes DPPH, ABTS e ensaio de varredura do Radical Ânion Superóxido realizados, apresentaram capacidade satisfatória para sequestrar radicais livres pois apresentaram um valor de CI^{50} semelhantes aos padrões utilizados, evidenciando percentuais de ação antioxidante bastante expressivos, pois quanto menor o valor de CI^{50} (concentração inibitória) apresentado pela amostra, maior é a sua capacidade antioxidante, pois será necessária uma quantidade menor da planta para reduzir 50% do radical livre.

Quanto a dosagem de fenóis e flavonóides da amostra, o resultado aponta o potencial antioxidante da amostra uma vez que o percentual encontrado foi relativamente alto quando comparado aos padrões ácido gálico e quercetina.

Caracterização Química do Extrato

A análise por HPLC-MS do extrato evidenciou uma complexa composição química com pelo menos 17 substâncias majoritárias detectadas (Figura 1). O perfil de fragmentação de parte destas substâncias foi idêntico entre picos distintos, indicando a existência de diversos compostos fenólicos isômeros. Compostos estes representados pela mistura de (+)- e (-)-catequinas (pico 1), dímeros de proantocianidinas (B1 e B2, picos 2, 3, 5, 7 e 8), dímeros de properlagodinas (picos 4 e 6, tr 2.98 e 3.66 min). Além destes compostos mencionados, a constituição majoritária da amostra é de versões isoméricas variadas de trímeros de

proantocianidinas (picos 9, 10, 11 e 12). Além desta classe de compostos fenólicos foram identificados os flavonóides taxifolina (pico 13), dois di-glicosídeos de Quercetina isoméricos (picos 14 e 15) e dois isômeros de glicosídeos do ácido cafeoilquínico (picos 16 e 17) em comparação com dados previamente publicados^{28,29,30}.

Avaliação da Atividade Antioxidante Celular

Na avaliação da atividade antioxidante celular (figura 2), o resultado mostrou que o extrato da seiva de Jatobá, quando comparado padrão de Quercetina, conseguiu inibir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular nas células da linhagem MRC-5 Fibroblásticas, sugerindo assim a sua atividade antioxidante celular, pois demonstrou potencial para neutralizar as ações dos radicais livres, evitando dessa forma a ocorrência do estresse oxidativo celular.

Avaliação da Viabilidade Celular

No ensaio de viabilidade celular, realizado pelo método Alamar Blue (figura 3), o resultado evidenciou que em suas concentrações mais baixas o extrato da seiva de Jatobá não apresentou qualquer efeito inibitório sobre a viabilidade das células MRC-5, visto que não apresentou morte celular em 100% de viabilidade, confirmando assim que o extrato não é citotóxico nas concentrações testadas.

Indução da Proliferação Celular

No ensaio de proliferação celular realizado pelo método de exclusão por Azul de Trypan em células MRC-5 de linhagem Fibroblásticas (figura 4), método quantitativo de avaliação da proliferação celular, o extrato da seiva de Jatobá, após

72h de exposição, induziu a proliferação das células, com um resultado aproximado do padrão de ácido ascórbico utilizado no ensaio e bem acima dos valores encontrado para o controle negativo do teste, demonstrando que o extrato da seiva de Jatobá foi capaz de induzir a um aumento na proliferação de fibroblastos *in vitro*.

Avaliação da Migração Celular

O ensaio da migração celular de fibroblastos da linhagem MRC-5 (figura 5), neste experimento o extrato da seiva de Jatobá e o ácido ascórbico que foi utilizado como controle positivo de proliferação, fecharam a lesão em 48 horas e em 72 horas houve a confluência de 100% de proliferação em ambos, evidenciando assim o potencial do extrato da seiva para promover a migração e proliferação celular *in vitro*.

Diante dos resultados *in vitro* sugere-se que a seiva de Jatobá apresenta potencial antioxidante e cicatrizante.

Efeitos do tratamento tópico com a pomada de Jatobá no fechamento das feridas de camundongos.

A análise morfométrica do fechamento da lesão no 3º dia pós-lesão, fase inflamatória da cicatrização, sugeriu que os animais tratados com a pomada contendo a seiva do Jatobá (CJ) apresentaram menor área de lesão, conforme observado ao longo de 14 dias de experimento, através das análises das imagens do acompanhamento da lesão (Figura 6-A) e celularidade (Figura 7 A-B), como demonstrado na análise histológica, quando comparados ao grupo controle (CV).

No 10º dia pós-lesão os animais tratados (CJ) demonstraram uma tendência a uma menor área da lesão quando comparados com os animais (CV), (Figura 6 A-B).

No 14º dia pós lesão, ainda era possível observar a presença da crosta, coágulo, resultante do processo de cicatrização no dorso dos animais, o que denotou um atraso no fechamento da ferida em ambos os grupos, quando se realizou a análise morfométrica (figura 6 A). Entretanto, na análise histológica do mesmo período, podemos observar a reepitelização, a presença de células da derme como fibroblastos e poucas células inflamatórias, características dessa fase, em ambos os grupos, mostrando que os animais que realizaram o tratamento tópico com a seiva de Jatobá evoluíram bem frente ao processo de cicatrização (figura 8 A-B).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho foram produzidos para gerar conhecimentos *in vitro* e *in vivo* sobre as atividades antioxidantes e cicatrizantes do extrato da seiva da espécie *Hymenaea courbaril* L (Jatobá). O presente estudo é o primeiro relato demonstrando essas atividades da seiva de Jatobá, utilizando metodologias que caracterizaram o processo de proliferação, crescimento, viabilidade e migração celular em fibroblastos e análises da cicatrização em modelo animal.

Inicialmente o extrato em acetato de etila da seiva de Jatobá foi avaliado quanto a sua capacidade sequestradora de radicais livres através dos testes DPPH, ABTS e SOD, apresentando forte atividade antioxidante, sendo seus efeitos comparáveis aos controles utilizados como padrão positivo para tais atividades, conforme Tabela 1. Esses resultados corroboram com um estudo anterior, que realizou os mesmos ensaios para avaliação do potencial antioxidante do *Hymenaea courbaril* L, mas utilizando-se dos extratos das cascas dos frutos de *Hymenaea courbaril* L em hexano, em acetato de etila e em metanol ³¹.

Conhecendo o mecanismo de ação de redução de moléculas de DPPH, bem como as principais classes químicas presentes em *Hymenaea courbaril* L, sugere-se que a ação antioxidante apresentada pode estar relacionada à presença de compostos com hidroxilas fenólicas disponíveis na planta, isoladas na fração de acetato de etila ³², bem como a presença de trímeros de proantocianidinas e de compostos fenólicos como os flavonóides taxifolina identificados na análise da composição química do extrato da seiva de jatobá realizada nesse estudo (Figura 1).

Estudos têm sido realizadas com o intuito de demonstrar importância da utilização de substâncias com potencial antioxidante e neles foi identificado que os compostos fenólicos são um dos principais grupos responsáveis por esta propriedade e dentre esses, estão os flavonóides, que podem ser encontrados nas folhas, sementes, cascas e flores de diversas plantas ³³. Os efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonóides são muito vastos, dentre estes destacam-se as ações antioxidante, anti-inflamatória, antiplaquetária, vasodilatadora e antimicrobiana, além de efeitos antialérgicos, sendo que quanto maior o teor de compostos fenólicos, maior será o seu potencial antioxidante ³⁴. Evidencia-se ainda na Tabela 1 que no extrato da seiva de Jatobá foi encontrado um significativo teor de compostos fenólicos, resultado esse que corrobora com os achados de um estudo semelhante que identificou altos teores de compostos fenólicos no extrato aquoso de Acerola (*Malpighia emarginata* DC.), Bacuri (*Platonia insignis* Mart.), Cajá (*Spondias mombin* L.), Caju (*Anacardium occidentale*), Goiaba (*Psidium guajava*) e Tamarindo (*Tamarindus indica* L.) e que realizou uma correlação positiva entre atividade antioxidante e as variáveis fenóis totais e flavonóides totais, ou seja, à medida que aumentaram os teores nas amostras, houve o aumento percentual da atividade

antioxidante das mesmas, confirmando que a atividade antioxidante está diretamente correlacionada aos teores de fenóis e flavonoides totais ³⁵. Esse estudo corroborou com achados do presente estudo, uma vez que a forte capacidade antioxidante frente aos radicais DPPH, ABTS e Ânion Superóxido (O₂⁻) pode ser atribuída aos altos teores de compostos fenólicos da espécie.

Os compostos fenólicos têm demonstrado capacidade ideal para remoção de radicais livres, por causa da sua formação estrutural química, mediante doação de um átomo de hidrogênio ou de um elétron, pois têm propriedades antioxidantes, que permitem que eles ajam como agentes redutores, doando hidrogênios e pelo potencial de quelação de metais ³⁶. Nesse sentido, devido ao teor de fenóis e flavonóides da amostra, o extrato da seiva de jatobá, inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular (Figura 2), confirmando a sua atividade antioxidante celular, pois os flavonóides interagem com as biomembranas e exercem a função de moduladores da fluidez, gerando um impedimento físico para a difusão das espécie reativas de oxigênio (ROS) e espécie reativas de Nitrogênio (ERN), de modo que há o decréscimo da cinética das reações responsáveis pelo estresse oxidativo ³⁷.

Estudo realizado *in vitro* em células de fibroblastos de derme, com as espécies *Camellia sinensis* Kuntze, *Rosa alternifolia* L. e *Hamamelis virginiana* L., que são espécies descritas na literatura como plantas de alto teor de compostos fenólicos ³⁸ assim como o *Hymenaea courbaril* L, constatou que essas espécies têm capacidade antioxidante.

Um outro estudo mostrou bons resultados de atividade antioxidante *in vitro* para os extratos de frutos de *Momordica charantia* L., porém nos estudos em células, os extratos induziram danos aos fibroblastos e queratinócitos, e por isso não foram considerados bons antioxidantes nos testes celulares ³⁹.

No presente estudo, o extrato da seiva demonstrou a capacidade de promover o crescimento e a proliferação celular em células MRC-5 de linhagem fibroblástica e também não apresentou morte celular em 50 % de viabilidade conforme figuras 3 e 4, confirmando que o extrato da seiva de Jatobá não é citotóxico até as concentrações testadas. Essa capacidade do extrato pode estar relacionado ao teor de compostos fenólicos presentes na amostra uma vez que quanto maior o teor de compostos fenólicos, maior será o seu potencial antioxidante.

Um estudo realizado em Gana com 17 espécies de plantas com possível potencial antioxidante revelou através dos ensaios de proliferação celular e migração *in vitro* que as espécies *Allophylus spicatus*, *Philenoptera cyanescens*, *Melanthera scandens*, *Ocimum gratissimum* e *Jasminum dichotomum* apresentavam atividade cicatrizante *in vitro*, sendo que o potencial de cicatrização das mesmas foi atribuída a presença de flavonóides glicosídico rutina nas amostras e um triglicósido de quercetina em *P. Cyanescens*⁴⁰. Esse resultado corrobora como ensaio de migração celular realizado nesse trabalho, conforme exposto na figura 5, pois o extrato da seiva de *H. courbaril*, apresentou potencial para promover a migração e proliferação celular, sendo que este mecanismo também pode estar relacionado a presença de fenóis e flavonóides na amostra.

Para a avaliação do potencial cicatrizante *in vivo*, foram utilizados os tempos experimentais do 3º e o 14º dias pós-lesão, para análise dos parâmetros de contração e reepitalização da ferida.

A análise morfométrica do fechamento da lesão no 3º dia pós-lesão sugere que os animais tratados com a pomada contendo a seiva do jatobá apresentaram, de forma significativa, menor área de lesão e menor celularidade (Figura 6 A-B). Esse resultado está de acordo com os achados de um estudo que avaliou o extrato da

espécie *Zeyheria tuberculosa* na cicatrização de feridas e que apresentou melhores resultados na redução do diâmetro da lesão e presença de reepitelização nos cortes histológicos quando comparados ao grupo controle ⁴¹.

Corroborando ainda com uma pesquisa onde se demonstrou que algumas plantas medicinais usadas popularmente, têm a capacidade de promover mecanismos de reparação tecidual, justificando o potencial de uso terapêutico no tratamento de feridas, principalmente no que se refere a avaliação do seu potencial cicatrizante, fornecendo evidências a partir de vários extratos e óleos essenciais a presença de compostos fenólicos em sua composição ⁴² e que compostos fenólicos podem ser efetivos na cicatrização de feridas (incluindo feridas crônicas) e queimaduras ⁴³.

O presente estudo sugeriu que o tratamento tópico com o extrato da seiva de Jatobá apresentou uma tendência a uma menor área de lesão e através das análises, pode-se observar a reepitelização e a celularidade em ambos os grupos (Figuras 7A e B e 8A e B), o que mostra que o os animais tratados com a formulação contendo o extrato da seiva de Jatobá contribuiu para o processo de cicatrização. O potencial antioxidante da amostra pode ser o fator que justifica essa atividade do extrato.

Em conformidade com esse resultado, um estudo que avaliou também a ação dos flavonóides na cicatrização em feridas limpas, induzidas cirurgicamente em ratos *Wistar*, utilizando um creme à base de chá verde e própolis ricos em flavonóides, identificou que entre os grupos não houve diferença estatística nos processos de cicatrização nos animais, apesar dos animais tratados com chá verde e própolis evoluírem melhor durante o tratamento ⁴⁴. Uma vez que constituintes fitoterápicos, já provaram propriedades de cicatrização de feridas, como exemplo, os taninos, terpenóides, diterpenos, sesquiterpenos, fitosterol, compostos fenólicos, proteínas, flavonóides, saponinas e óleos essenciais, pois podem facilitar o processo de

cicatrização, através da remoção de radicais livres, aumentando a contração da área afetada e aumentando a formação de vasos sanguíneos e fibroblastos ⁴⁵, justifica-se o resultado encontrado nesse estudo.

Até o presente momento, não foram identificados trabalhos clínicos ou experimentais que tenham avaliado a ação do extrato da seiva de Jatobá no processo de cicatrização de ferida. Sendo assim, não foram encontrados estudos com a mesma espécie para a comparação dos resultados. Desta forma este estudo torna-se pioneiro em descrever esta atividade para este material vegetal.

Os resultados obtidos dos experimentos realizados nesse trabalho mostraram, de maneira inédita, que extrato da seiva de *Hymenaea Courbaril L* apresentou efeito antioxidante que contribuiu na cicatrização de feridas no dorso de camundongos, corroborando as evidências demonstradas em diversos estudos etnofarmacológicos e justificando o uso dessa espécie na medicina popular.

CONCLUSÃO

O extrato da seiva de *Hymenaea courbaril L* (jatobá) apresenta potencial para a indução da cicatrização de feridas cutâneas, o que pode ser induzido, entre outras propriedades, pela sua atividade antioxidante demonstrada.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflitos de interesse

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento recebido por agências de fomento como CAPES, CNPq e FAPEAM que custearam parte dos experimentos realizados no

Laboratório do Professor Emerson Lima. Também agradecem a Professora Dra. Luciana Biagini Lopes, por sua contribuição em disponibilizar seus equipamentos para a realização das análises histológicas no Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP – ICB/USP.

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO - dimetilsulfóxido

DPPH - Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

ABTS -Radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

DCFH-DA -2'7'-dicloro-fluoresceína-diacetato

PBS- tampão fosfato salino

AAPH- 2,2- azobis amidinopropano

CONCEA -Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CEUA -Comitê de Ética e Pesquisa em Animais

TJ- Tratamento Jatobá

CV- Controle Veículo

NIH -Image J

H&E -Hematoxilina/Eosina

REFERÊNCIAS

1. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. **Cicatrização de feridas**. ABCD, arq. bras. cir. dig. [online]. 2007; 20 (1): 51-8.
2. Pessoa AF, Florim JC, Rodrigues HG, Andrade-Oliveira V, Teixeira SA, Vitzel KF et al. Oral administration of antioxidants improves skin wound healing in diabetic mice. **Wound Rep and Reg**. 2016; 24: 981–93.
3. Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski R, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. **Life sciences**. 2014; 116 (1): 1-7.
4. Lima, MH, Caricilli AM, de Abreu LL, Araujo EP, Pelegrinelli FF, Thirone AC, et al. Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial. **PLoS one**. 2012; 7: e36974.
5. Maver T, Maver V, Stana KK, Smrke DM, Kreft S. A review of herbal medicines in wound healing. **International journal of dermatology**. 2015;54 (7): 740-51.
6. Kumar B, Vijayakumar M, Gouindarajan R, Pushpangadan P. Ethnopharmacological approaches to wound healing—exploring medicinal plants of India. **J Ethnopharmacol**. 2007; 114(2) 103-13.
7. Clay JW, Sampaio PT, Clement CR. **Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Instituto nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 1999: 409p
8. Melo MGG, Mendonca MS, Mendes AMS. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amaz**. 2004; 34 (1):9-14.
9. Cartaxo SL, Souza MMA, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 2010 ;131 (2) : 326–42.
10. Martins CHG, Souza FR, Fonseca C, Casemiro LA, Furtado NAJC, Ambrosio SR, Cunha WR. Determinação in vitro da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaea courbaril* L. **Investigação**. 2010; 10 (2): 37-43.

11. Shanley P, Medina, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. CIFOR. 2005: 300p
12. Vale CR, Silva CM, Oliveira AL, Silva SC, Chen-Chen. Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic, and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice. *Genetics and Molecular Research*. 2013; 12 (3): 2712-24.
13. Jayaprakasam B, Alexander-Lino RL, Dewitt DL, Nair G. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chemistry**. 2007;105 (2): 485–90.
14. Cecílio AB, Faria DB, Oliveira PC, Caldas S, Oliveira DA, Sobral MEG, Duarte MGR et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**. 2012; 141: 975–81.
15. Abdel-Kader M, Berger JM, Slebodnick CHJ, Malone S, Wisse JH, Werkhoven MCM et al. Isolation and absolute configuration of *ent*-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **J. Nat. Prod.** 2002; 65(1) 11-15.
16. Fernandes TT, Santos AT, Pimenta FC. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Rev. Patol. Trop.** 2005; 34 (2):113-122.
17. Gabrieli PB, Roberto WSG, Terezinha SB, Francisco JBL, Mary Anne MB, Nirla RR et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013; 149: 62–69.
18. Maysa PC, Marize CVB, Wanessa MA, Carolina RC, Alessandro LS, Cecília MAO et al. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. **BMC complementary and alternative medicine**. 2014; 14: 245.
19. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, Zurich**. 1995; 28 (1): 25-30.
20. Roberta RE, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**. 1999; 26 (9-10): 1231- 37.

21. Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Anal. Biochem.** 1995; 232 (2):243–48.
22. Singleton VL, ROSSI JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture.** 1965; 16 (3): 144-158.
23. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry.** 1999; 64 (4): 555-9.
24. Wolfe KL, Liu RH. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. **J. Agric. Food Chem.** 2007; 55 (22): 8896–907.
25. Freshney I. Animal cell culture: introduction to biotechniques Edited by SJ Morgan and DC Darling. **Bioessays.** 1994; 16:218.
26. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **J Immunol Methods.** 1997; 204(2):205-8.
27. Flora A, Angela V, Sergio C, Vittoria D, Pietro F, Stefano G. Comparison between fibroblast wound healing and cell random migration assays in vitro. **Exp Cell Res.** 2016; 347 (1): 123–32.
28. Fracassetti D, Costa C, Moulay L, Tomás-Barberán FA. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry.** 2013; 139 (1-4): 578-588.
29. Kajdžanoska M, Gjamovski V, Stefova M. HPLC-DAD-ESI-MSn identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.** 2010; 29(2): 181-194.
30. Mullen W, Yokota T, Lean ME, Crozier A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSn. **Phytochemistry.** 2003; 64(2): 617-624.
31. Aguiar JC, Estudo fitoquímico e biológico de *Hymanaea courbaril* L. 2009 139p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Faculdade de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
32. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS et al.

Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. 2001; 15 (2): 127-130.

33. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**. 2002; 13: 572–84.

34. Degáspari CH, Waszczyński N. Antioxidants Properties of Phenolic Compound. **Visão Acadêmica**. 2004; 5 (1): 33-40.

35. Sousa MSB, Vieira LM, Lima A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian J. Food Technol**. 2011; 33 (3):887-97.

36. Khokhar S, Apenten RKO. Iron binding characteristics of phenolics compounds: some tentative structure-activity relations. **Food Chem**.2003;81: 133- 40.

37. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 2006; 29 (1): 113-23.

38. Thring TSA, Hili P, Naughton D. Antioxidant and potential antiinflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. **Journal of Inflammation**.2011; 8: 27

39. Kumar R, Balaji S, Sripriya R, Nithya N, Uma TS, Sehgal PK. In vitro evaluation of antioxidants of fruit extract of *Momordica charantia* L. on fibroblasts and keratinocytes. **J Agr Food Chem**.2010; 28: 1518-522.

40. Freiesleben SH, Soelberg J, Nyberg NT, Jäger A. Determination of the Wound Healing Potentials of Medicinal Plants Historically Used in Ghana. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2017; 2017.

41. Majewska I, Gendaszewska-Darmach E. Proangiogenic activity of plant extracts in accelerating wound healing - a new face of old phytomedicines. **Acta Biochim Pol**.2011; 58 (4) :449-60.

42. Patrícia AS, Terezinha RA, Ana OS, Pinto JX, Ingrid ML, Maria LA. Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**.2014; 22 (1): 165-72.

43. Działo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17 (2):160.

44. Vieira AP, Santos NR, Borges JH, Vincenzi MP, Schmitz WO. Semina: Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. *Ciências Biológicas e da Saúde.* 2008; 29 (1): 65-74.

45. Ghosh PK, Gaba A. Phyto-extracts in wound healing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2013;16 (5): 760-820.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Tabela 1. Avaliação da Capacidade Antioxidante da seiva do extrato de Jatobá extraído com acetato. Resultados da triagem fitoquímica realizada através dos testes Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), Radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), ensaio de varredura do Radical Ânion Superóxido (O₂⁻), dosagem de Fenóis e Flavanóides do extrato acetato da seiva em comparação com os padrões Ácido Gálico, Trolox e Quercetina e a CI⁵⁰µg/ml (média de inibição). Os valores representam a média ± desvio padrão.

Figura 1. Espectro de íons totais da amostra do extrato bruto da seiva do jatobá obtido pela técnica de HPLC-MS/MS com ionização por eletro spray no modo negativo.

Figura 2. Atividade Antioxidante Celular. Oxidação induzida por radical peróxido de DCFH --DA em células da linhagem MRC-5 Fibroblásticas e inibição da oxidação por quercetina e extrato da seiva de jatobá ao longo de 24 hs.

Figura 3- Avaliação da Viabilidade Celular após exposição ao extrato da seiva de jatobá de fibroblastos nas concentrações de (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg/mL), pelo método Alamar Blue. As linhagens celulares (MRC-5), foram plaqueadas na concentração de 0,5 x 10⁴ células por poço (100 µL de meio DMEM com SBF 10%) em placas de 96 poços. As células foram tratadas com o extrato da

seiva nas concentrações de (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg/mL). O experimento foi realizado em triplicata para cada período de tratamento (24h). (***) p<0.001) diferença estatística do jatobá em relação ao controle;(###) p<0.001 diferença estatística do jatobá em relação a Doxorrubicina.

Figura 4 - Avaliação da Curva de Crescimento e Proliferação celular de fibroblastos tratados com extrato de acetato da seiva de Jatobá a 50 µg / mL (teste Azul de Trypan) (*) p<0.001, diferença estatística do jatobá em relação ao controle; ### P<0.001, diferença estatística do jatobá em relação ao ácido ascórbico).** As células de fibroblastos MRC-5 foram plaqueadas na concentração de 3×10^4 de células/mL (meio DMEM, com SBF 10%) em placas de 24 poços, mantidas em estufa a 37 °C, e 5% de CO₂. O teste teve intervalos medidos em três tempos experimentais: 24, 48 e 72 h de contato com a seiva de Jatobá na concentração de 50 µg/ mL. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® (One way /ANOVA/ Kruskal-Wallis).

Figura 5 – Avaliação da migração celular após exposição ao extrato da seiva de jatobá. Ensaio de migração celular, mostrando a motilidade de fibroblastos tratados com ácido ascórbico 50 µg/ mL e Extrato da seiva de jatobá a 50 µg/ mL. Os fibroblastos MRC-5 foram plaqueados na concentração de 50×10^4 de células/mL (meio DMEM, com SBF 10%) em placas de 12 poços, mantidas em estufa a 37 °C, e 5% de CO₂. O teste teve intervalos medidos em três tempos experimentais: 24, 48 e 72 h de contato com extrato da seiva. As placas com as células tratadas foram então analisadas em microscópio óptico, para avaliação da motilidade celular. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® (One way /ANOVA/ Kruskal-Wallis).

Figura 6: Evolução da cicatrização em animais controles e tratamento jatobá no dia 0, 1º 3º, 7º, 10º, 12º e 14º dias pós – lesão. A) Painel apresentando a progressão do processo de cicatrização em animais controles e tratados com creme de jatobá; B) Gráfico representando a porcentagem do fechamento da área, mínimo de 07 animais por grupo. Tratamento com concentrações de 2% do extrato da seiva de jatobá. As feridas foram fotografadas ao longo do tempo e área de ferida foi medido usando o

programa Image J software (NIH). Os valores são apresentados como média \pm EPM. (*) $p < 0,05$, para diferença significativa em relação ao controle não tratado, como indicado por ANOVA one - way e pós - teste de Kruskal-Wallis).

Figura 7: Micrografia da área da lesão no 3º dia pós - lesão em camundongos controles sem tratamento e tratados com creme de jatobá a 2 %. Histologia 3º dia pós - lesão, por coloração de H&E. Painel mostra a área da lesão nos grupos controle e tratados com creme de jatobá a 2% . Áreas visualizadas com aumento de 40 X (A e B). Os valores são apresentados como média \pm DP. (%%) $p < 0.01$ para diferença significativa em relação aos demais grupos, como indicado por ANOVA two-way e pós-teste de Kruskal-Wallis.

Figura 8: Micrografia da área da lesão no 14º dia pós - lesão em camundongos tratados com pomada sem (CV) e com seiva de jatobá (CJ) a 2 %. Histologia 14º dia pós - lesão, por coloração de H&E. Painel mostra a área da lesão nos grupos tratados com pomada sem (CV) e com seiva de jatobá (CJ) a 2 %. Os valores são apresentados como média \pm DP. (%%) $p < 0.01$ para diferença significativa em relação aos demais grupos, como indicado por ANOVA two-way e pós-teste de Kruskal-Wallis

ANEXOS

Tabela 1

AMOSTRA	DPPH CI ⁵⁰ µg/ml	ABTS CI ⁵⁰ µg/ml	SOD CI ⁵⁰ µg/ml	FENÓIS	FLAVONÓIDES
Acetato da Seiva	5.43±0.05	1.73±0.05	22.56± 0.37	77.55±3.29	13.16±1.64
	4.36±0.23	3.30±0.18	23.96±0.70	534.77±22.87	65.42±8.87
Padrão	Trolox	Trolox	Ácido Gálico	Ácido Gálico	Quercetina

Figura 1

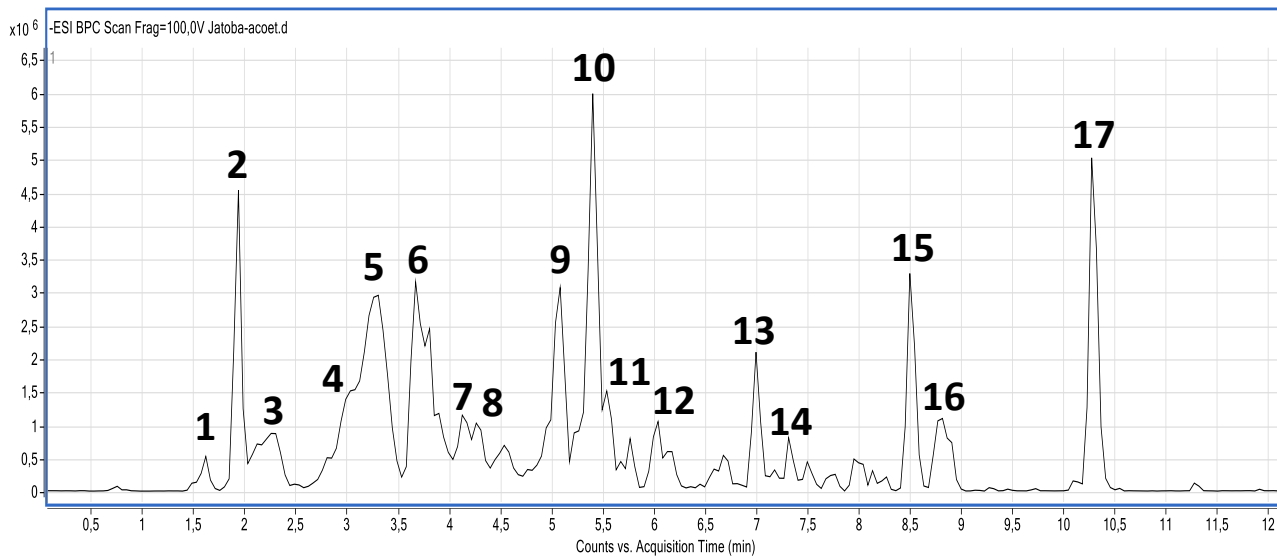


Figura 2

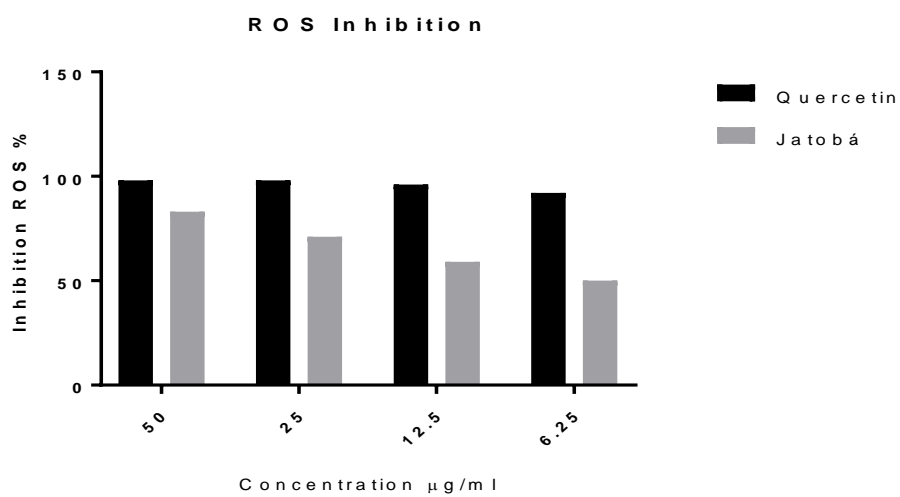


Figura 3

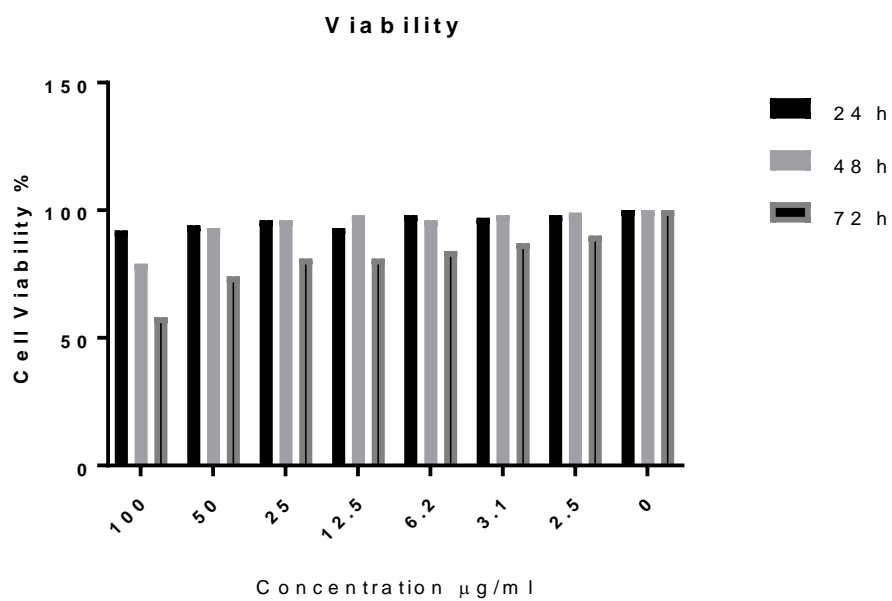


Figura 4

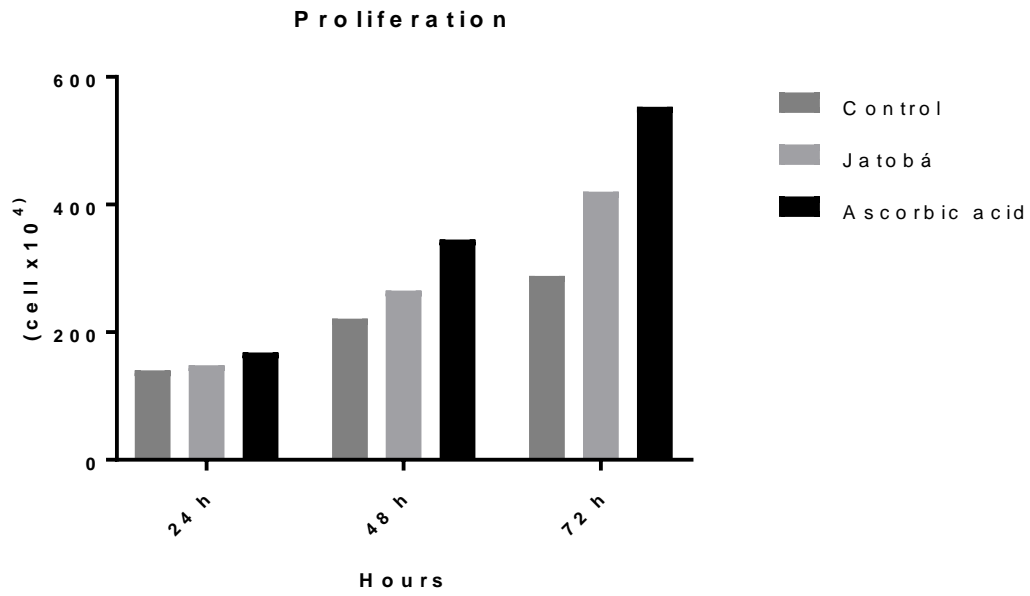


Figura 5

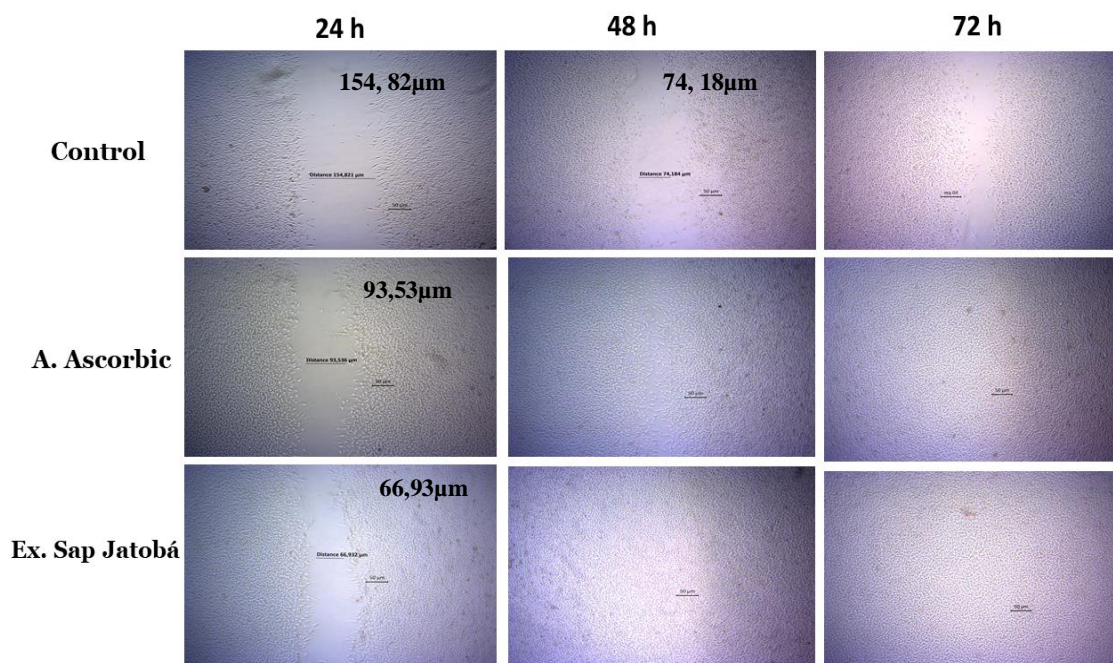


Figura 6

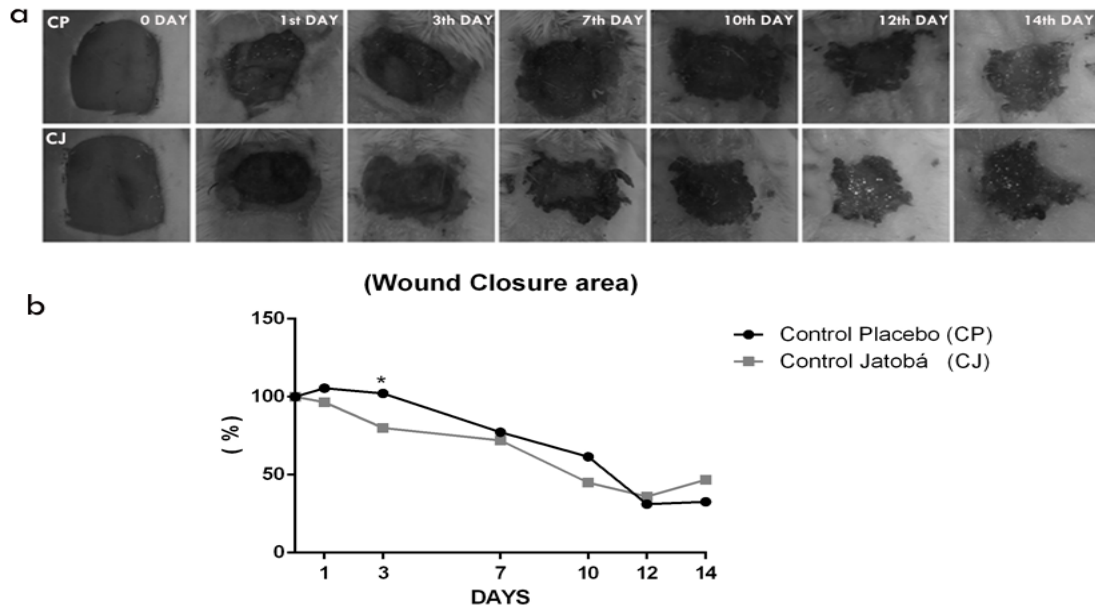


Figura 7

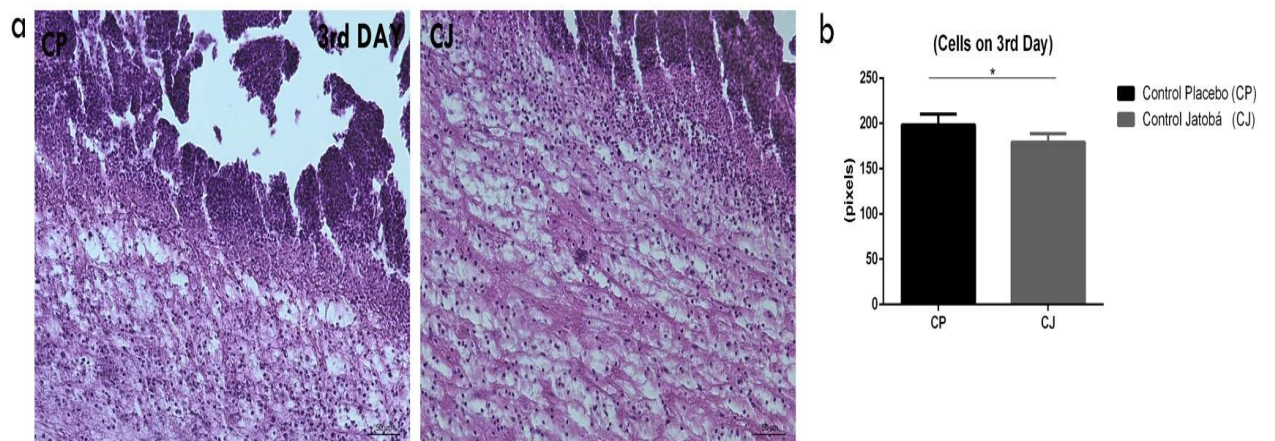
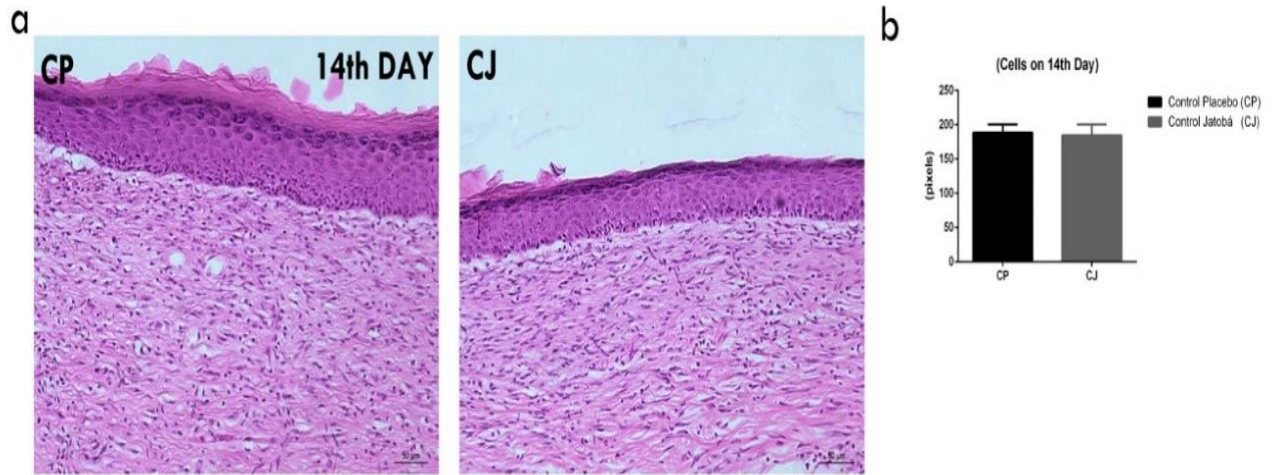


Figura 8



VI. REFERÊNCIAS

- 1- Lejla Z, Armin S, Amra D. Historical Contribution of Pharmaceutics to Botany and Pharmacognosy Development. REVIEW. **Mater Sociomed.** 2017; 29 (4): 291-300
- 2- Devienne KF, Raddi MSG, Pozetti, GL. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** 2004; 6: 11-14.
- 3- Leão RB, Ferreira, MR, Jardim MA. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia.** 2007; 88 (1); 21-25.
- 4- Hamilton A. **Medicinal plants and conservation: issues and approaches.** International Plants Conservation Unit. 2003
- 5- Araújo EC, Oliveira, RAG, Coriolano AT, Araújo ECA. Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde.** 2007; 8 (2): 44-52.
- 6- Tomazzoni MI, Negrelle RR, Centa ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm.** 2006;15(1):115-21.
- 7- Leite JP. Desenvolvimento de Fitoterapia. **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas.** 1 ed. Juiz de Fora. MG: Atheneu: 2009.
- 8- Amorim ELC, Lima CSA, Higino JS, Silva LRS, Albuquerque UP. Fitoterapia instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infama.** 2003;15(1-3): 66-9.
- 9- Costa AFE, Frota JG, Lima MC, Moraes MO. Plantas medicinais utilizadas por pacientes atendidos nos ambulatórios do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. **Pesq Med Fortaleza** 1998; 1(2): 20-5.
- 10- Pestana LT. **Estudo taxonômico de *Hymenaea* L.: complexo *H. courbaril*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae: Detarieae).** 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.
- 11- Andrade LA, Bruno RL, Oliveira LS, Silva. Aspectos biométricos de frutos e sementes, grau de umidade e superação de dormência de jatobá. **Acta Scientiarum Agronomy.** 2010; 32(2):293-99.
- 12- Albuquerque UP, AndradE LHC. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do Agreste do Estado de Pernambuco. **Interciência.** 2001;27(7):64-72.

- 13- Caramori SS, Lima CS, Fernandes KF. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.2004;47(2):35-42.
- 14- Melo MGG, Mendonça MS, Mendes AMS. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.)(Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amaz.** [online]. 2004; 34(1): 9-14.
- 15- Gazzaneo LR, De Lucena RF, Albuquerque UP. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **J. Ethnobiol. Ethnomed.** 2005; 1: 9
- 16- Gonçalves AL, Filho AA, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.** 2005;73(3):353-58.
- 17- Agra MF, Freitas PF, Barbosa FJM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.2007;17:114–40.
- 18- Shanley P, Medina G. Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. 1 ed. Belém-PAB: **CIFOR**: 2005.
- 19- Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**.UNESP.2002; 2: 592p
- 20- Silva MS, Leite KRB, Saba MD. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae- Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 2012;14: 673–79.
- 21- Pinto Sobrinho FA, Guedes-Bruni RR, Christo AG. Uso de plantas medicinais no entorno da Reserva Biológica de Tinguá, Nova Iguaçu, RJ **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.** 2011; 9(2): 195-206.
- 22- Miyake M, Ide K, Sasaki K, Matsukura Y. Oral administration of highly oligomeric procyanidins of Jatoba reduces the severity of collagen-induced arthritis. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 2008;72 (7): 1781-8.
- 23- Nogueira RT, Shepherd GJ, Laverde A Jr, Marsaioli AJ, Imamura PM. Clerodane-typed diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**. 2001; 58 (8) B: 1153-57.

- 24- Abdel-Kader M, Berger JM, Slebodnick C, Hoch J, Malone S, Wisse JH, Mamber S, et al. Isolation and absolute configuration of ent-Halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **J. Nat. Prod.** 2002;65: 11–5.
- 25- Simões K Du J, Pessoni RAB, Cardoso-Lopes EM, Vivanco JM, Stermitz F R. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry Letters**.2009; 2: 59–62.
- 26- Jayaprakasam B, Dewitti D, Rubi LAL, Muraleedhara GN. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chem.** 2007;105:485–90.
- 27- Gabrieli PB, Roberto WSG, Terezinha SB, Francisco JBL, Mary Anne MB, Nirla RR et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013; 149: 62–9
- 28- Kumar B, Vijayakumar M, Gouindarajan R, Pushpangadan P. Ethnopharmacological approaches to wound healing—exploring medicinal plants of India. **J Ethnopharmacol.** 2007;1114 (2):103-13.
- 29- Oliveira, F P . Classificações de intervenções e resultados de enfermagem em pacientes com feridas: mapeamento cruzado. **Rev. Gaúcha Enferm.** 2016; 37 (2) e55033.
- 30- Ferguson, M. W., & O'Kane, S. (2004). Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**2004: 359(1445), 839-50.
- 31- Zaho Z, Hochwalt PC, Usui ML, Underwood RA, Singh PK, James GA, et al. Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm challenge: a model for the study of chronic wounds. **Wound Repair Regen** 2010. 18(5):467-77.
- 32- Charlesworth B et al. Dressing-related trauma: clinical sequelae and resource utilization in a UK setting. **Clinicoecon Outcomes Res.** 2014; 6:227-39.
- 33- Lara MO. Significado da ferida para portadores de úlceras crônicas. **Cogitare Enferm.** 2011;16(3):471-7.
- 34- Herson MR, Kamamoto F, Ferreira MC. **Cicatrização de Feridas**. Clínica Cirúrgica, 9 ed. Barueri, SP: Ed. Manole: 2008.

- 35- Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK., Cicatrização de feridas. ABCD. **Arq. bras. cir. dig.** [online]. 2007; 20 (1): 51-8.
- 36- Sengupta M, Banerjee P, Suhrita P, Sengupta J, Ghosh M. Healing effect of phenytoin on excisional wound in experimental albino rats. Muller **Journal of Medical Sciences and Research.** 2015; 6: 27-30.
- 37- Efron PA, Moldawer, LL. Cytokines and wound healing: the role of cytokine and anticytokine therapy in the repair response. **J. Burn Care Rehab.** 2000; 25(2): 149-60.
- 38- Park JE, Barbu L A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am. J. Surg.** 2004; 187: 11-16.
- 39- Hatanaka E, Curl R. Fatty acids and wound healing: a review. **Rev. Brás. Farm.** 2000; 88 (2); 53-8.
- 40- Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. **Prog Histochem Cytochem.** 2007; 42(3): 115-170.
- 41- Clark RAF. **Wound repair.** In: Kumar, Robbins, Cotran: **Pathologic Basis of Disease** Ed. Saunders. 2005; 7: 112.
- 42- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol.** 2007; 127(3): 514-25.
- 43- Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. **Cellular aspects of wound healing.** Anais da Academia Brasileira de Dermatologia. 2009; 84(3): 257-62.
- 44- Canhamero TA. **Estudo dos mecanismos genéticos e celulares durante a fase inflamatória do processo de regeneração tecidual em animais selecionados geneticamente para máxima resposta inflamatória aguda homocigotos para os alelos R ou S do gene Slc11a1.** Dissertação. Programa de pós-graduação em imunologia do instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo. 2009.
- 45- Prentice WE. **Fisioterapia na prática esportiva uma abordagem baseada em competências.** Porto Alegre. Artmed. 2012; 14: 329p
- 46- Campos ACL, Borges-Branco A, Groth A K. **Cicatrização de feridas.** ABCD, arq. bras. cir. dig. [online]. 2007; 20 (1): 51-8.
- 47- Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. **J Exp Med.** 1972; 135: 719-34

48- Dutton M. **Fisioterapia ortopédica, exame, avaliação e intervenção**. 2 ed. Porto Alegre: Ed.Artmed:2010.

49- Doillon CJ, Dunn MG, Bender E et al. Collagen fiber formation in repair tissue. Development of strength and toughness. **Collagen Rel Res** 1985;(5):481

50- Herson MR, Kamamoto F, Ferreira MC. **Cicatrização de Feridas**. Clínica Cirúrgica. Barueri, SP: Manole, 2008 ;9:121-129.

51 -Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. **Anais da Academia Brasileira de Dermatologia**. 2009;84(3):257-62.

VII. ANEXOS

VII.1- Normas da Revista Wound Repair and Regeneration

Author Guidelines

Wound Repair and Regeneration: The International Journal of Tissue Repair and Regeneration is the official publication of the Wound Healing Society, the European Tissue Repair Society, the Japanese Society for Wound Healing, and the Australian Wound Management Association. This Journal publishes original scientific and/or clinical papers on the broadly defined topics of wound healing and tissue regeneration. Articles that significantly advance the knowledge of processes involved with wound healing and regeneration in all tissues and organisms, or that provide new insights into clinical therapies will be given highest priority. Manuscripts that describe product evaluations will be considered but will receive lower priority. The Journal also welcomes articles that provide the reader with a thorough understanding of a specific methodology or technique pertinent to wound healing and regeneration studies. These articles will be subjected to the same peer review as regular research articles.

Questions about submissions can be directed to: wrr_edoffice@wiley.com

Authors for whom English is a second language should have their manuscripts professionally edited by a native English speaker before submission. Wiley Editing Services is one resource for English-language editing. More information can be found at: <http://wileyeditingservices.com/en/>. All services are paid for and arranged by the author, and use of this service does not guarantee acceptance or preference for publication.

ARTICLE TYPES

Short Submissions

Biomedical Hypothesis should present an untested original hypothesis backed up solely by a survey of previously published results rather than any new evidence. Hypotheses should not be reviews and should not contain new data. They should be

short articles (abstract of 150 words, body of the paper should be 500-1500 words, 2 figures or tables, 10-15 references) outlining significant progress in thinking that would also be testable, though not so easily testable that readers will wonder why the testing has not already been done.

Brief Communication may report original data or discuss published articles (abstract of 150 words or less, body of the paper should not exceed 1,500 words, 2 figures or tables, and 15 references). Brief Communications that contain original data will be fully peer-reviewed. In published form they should not to exceed 3 printed journal pages.

Letter to the Editor is usually written in response to a recent published article in the journal (Letters should not have an abstract; body of the letter should not exceed 1,000 words, 2 figures or tables, and 10 references). The Editor will normally solicit a response from the authors of the cited article. All Letters to the Editor are subject to editing and possible abridgment.

Case Report and Case Series. This journal does not review or publish this type of submission. Case studies should be submitted to a wound care journal.

Commentary. This type of submission is by invitation only.

Editorial. This type of submission is by invitation only.

Supplement. This type of submission is by invitation only.

Full Papers:

Original Research Article can be in 1 of 4 subcategories: Clinical Science, Basic Science, Regeneration Science or Young Investigator Award, that focuses on original, unpublished data generated by the submitting authors that is relevant to wound healing, tissue repair and regeneration, with the exceptions of hard tissues such as bone and cartilage, highly specialized tissues such as nerve, or other topics that are deemed by the editors to be outside the scope of interest of a general wound healing readership (abstract should not exceed 300 words, the body of the text should not exceed 21 manuscript pages, tables and figures should be limited to those needed to provide the most concise display of experimental design, compiled results and

conceptual interpretations; in total not to exceed 8, and references should not exceed 40).

Clinical Science Articles cover human clinical trials, meta-analyses and other work relevant to investigation of evidence-based, advanced wound treatment and care. Clinical trials should be registered in clinicaltrials.gov or comparable public database, and the appropriate citation included in the article.

Basic Science Articles focus on new paradigms for advancing the basic understanding of wounds and healing, development of novel interventions and analyses, and other research involving in vitro, in vivo or in silico (mathematical) models. Analytical studies of human material beyond the realm of clinical care may also be considered as Basic rather than Clinical Research.

Regeneration Science deals with the unique restoration of tissues and organs beyond the normal capabilities of post-natal healing. It involves the regrowth of lost or destroyed organ components to their original pre-wounded structure and function.

Young Investigator Award Article. If the lead author has been recognized as a Young Investigator finalist at the annual meeting of the European Tissue Repair Society or the Wound Healing Society, and this paper is a report based on your presentation at the meeting, this option should be used. The cover letter must include documentation of this award.

Perspective Article [Invited Submissions Only] is a concise, contemporary review of a timely and relevant topic in the field of wound healing, tissue repair or regeneration, focusing on citations within the past 5 to 8 years (the body should not exceed 30 manuscript pages, should have not more than 6 total figures and tables, and should have a sufficient, but not excessive number of references ideally not to exceed 150). At least one of the article figures should provide a lucid, graphic depiction of critical concepts contained within the article, potentially suitable as cover art. Color charges will be waived for this illustration.

Note: authors should submit an initial proposal and article outline via email to the editorial office prior to submission. Unsolicited Perspective articles will be returned.

Technical Article describes a novel or re-worked methodology relevant to the study of wounds and wound healing. It is shorter than an original research paper (the body should not exceed 12 manuscript pages, figures and tables should be limited to those that are essential, but should not exceed 6 in total and should not exceed 30 references).

Submission of Manuscript

The Journal requires submission of manuscripts using our online manuscript processing system WRR-Manuscript Central TM. This system may be accessed at <http://mc.manuscriptcentral.com/wrr>. Authors MUST suggest the names of three reviewers for the manuscript, ONE OF WHICH MUST BE AN EDITORIAL BOARD MEMBER. However, selection of the referees will be determined by the Editor. Authors are also encouraged to indicate individuals they feel should NOT be considered as reviewers.

The Journal requires that for each submission, the submitting author provides written assurance that the paper has not been previously published and that no other submission or publication will be made. Abstracts of oral or poster presentations are not considered to constitute prior publication. Copyright to all papers is vested in the Wound Healing Society. Manuscripts purporting to contain original material will be considered for publication with the understanding that neither the article nor any of its essentials, including tables and figures, has been or will be published or submitted for publication elsewhere before appearing in this Journal. When submitting a paper, the submitting author should always make a full statement to the editor-in-chief about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant, duplicate or overlapping significantly with the presently submitted paper to WRR. The submitting author should also alert the Editor-in-Chief if the research in the current submission to WRR includes subjects about which a previous report has been published. Any such research should be referred to and referenced in the WRR paper. The Editor-in-chief

will assess the information provided by the submitting author and subsequently may request copies of such previously published, in-press, or submitted (to another journal) papers before further review is permitted. It is the responsibility of the submitting author to disclose to the Editor any significant financial interests they may have in products mentioned in their manuscript. This information will be deemed confidential and will only be disclosed to manuscript reviewers if, in the opinion of the Editor, the information is directly pertinent for an informed review.

General Instructions

Manuscripts must be submitted for review through the WRR website at <http://mc.manuscriptcentral.com/wrr>. Step-by-step instructions for formatting and uploading manuscripts are available on the opening screen of the site. Save your text and tables as Word or RTF (rich text format) files. Figures should be submitted in TIFF (min 300dpi resolution), EPS (vector graphics), PDF (with fonts embedded), PPT/PPTX, DOC/DOCX, or AI format. Type the manuscript using a 12-point font size, set text margins at 1inch from edge, number your manuscript pages beginning with the title page, and double-space all elements of the paper, organized in the following order:

1. Cover Letter with Assurances
2. Title Page
3. Abstract
4. Introduction
5. Materials and Methods
6. Results
7. Discussion
8. Acknowledgments
9. Footnotes
10. References
11. Tables
12. Figure Captions

*Upload Figures and any supplementary files separately

Cover letter with Assurances

This letter from the submitting author must provide written assurance that the paper has not been previously published and that no other submission or publication of the original work has been or will be made. Abstracts or oral or poster presentation are not considered to constitute prior publication. The submitting author must further assure that every author listed meets the qualifications for authorship (see below) and has had the opportunity to read and comment upon the submitted manuscript.

Title page

The title page should include (a) the title of the article, which should be concise but informative; (b) first name, middle initial, and last name of each author, with highest academic degree(s) and institutional affiliation; (c) name of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed; (d) name, address, telephone number, fax number, and email address of corresponding author; (e) name and address and email address of the author to whom requests for reprints should be addressed, (f) short running title, and (g) key words.

Authorship

All persons designated as authors must qualify for authorship according to guidelines established by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>).

Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. General supervision of the research group is also not sufficient for authorship.

Abstract

The second page should contain an abstract of not more than 300 words. The abstract should state the purpose of the investigation, basic procedures, main findings (BE SPECIFIC), and the principal conclusion. Emphasize new or unique aspects of the

investigation. Abbreviations should not be used in the abstract. Generally, the abstract should be a single paragraph and should NOT be structured into separate sections with headings.

Text

The text of the manuscript should be divided into the following sections with headings:

Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgments.

Longer articles may be further divided with appropriate subheadings. For original research papers, the body of the text including title page should not exceed 21 pages, and the number of references should be limited to 40 or fewer. Tables and figures should be used to support all reported results, but should not be redundant and should be limited to those necessary for data presentation and interpretation. For perspective articles, the manuscript length and number of references may be greater, and will be determined by the Editor.

Introduction

State the purpose of the article; for original research, the statement of a hypothesis to be tested is appropriate. Summarize the rationale for the study, giving only pertinent references, and do not review the subject extensively. Do not include data or conclusions in this section from the work to be reported.

Materials and Methods

Identify the methods, apparatus (include manufacturer's name, city and state or country in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references for established methods; provide references and brief descriptions for methods that have been published but are not well known; and describe in greater detail new or substantially modified methods (if deemed necessary, a diagram or flow chart may be used for complex procedures). Identify precisely all drugs and chemicals used, including generic name(s), dose(s), and route(s) of administration.

Ethical Considerations

Human Investigations: Manuscripts reporting data obtained from research conducted in human subjects must comply with the ethical rules for human experimentation that are stated in the 1975 Declaration of Helsinki, including approval by the institutional review board - or human experimentation committee. Authors must disclose this compliance within the Materials and Methods section.

Animal Investigations

Study protocols must be in compliance with the institution's guidelines or the National Research Council's criteria for humane care as outlined in the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, Revised 1985, <http://books.nap.edu/catalog/5140.html>).

Researchers from countries other than the US are encouraged to consider guidelines of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, international (<http://www.aaalac.org/index.cfm>) and to recommend membership in this organization to their institutions. A statement of assurance of the humane treatment of research animals must be provided within the Materials and Methods section.

Statistics

Statistical methods must be described in sufficient detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Whenever possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty. Statistical probability (p) should be reported in tables, figures, and figure legends at only one of the following levels: p

Results

The narrative of the text should take the reader through a logical progression of data consideration and interpretation. Present results in a logical sequence in the text,

tables, and illustrations. DO NOT repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize or summarize only important observations.

Significant Figures: Quantitative data should be expressed in accordance with the precision of the measurement technique reflected by the use of an appropriate number of significant figures, which is dependent on the standard deviation. In general, the standard deviation is expressed with 1 or 2 significant figures and the associated value should agree in place with the expressed standard deviation. For example, 10.3798 ± 0.2573 should be expressed as 10.4 ± 0.3 or $10.4 (0.3)$ and 357.521 ± 15.36 should be expressed as 358 ± 15 or $358 (15)$, where the second value is the standard deviation.

<http://www.facstaff.bucknell.edu/kastner/CHEM221/announcements/sigfig.html>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556591/>

Discussion

Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. DO NOT repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results sections. Include in the Discussion section the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. It is appropriate to briefly discuss how the results fit into (or deviate from) the larger body of published work on the topic. Link the conclusions with the goals of the study, and avoid unqualified statements and conclusions not supported by the data. State the hypotheses when warranted but clearly label them as such.

Acknowledgments

This section should contain one or more statements that specify (a) contributions that need acknowledgment but do not justify authorship; (b) acknowledgment of technical help; (c) acknowledgments of financial material support (specify the nature of the support); (d) financial relationships that may pose a conflict of interest.

Source of funding: Identify all internal and external sources of financial support for the work.

Pursuant to US National Institutes of Health (NIH) mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication.

For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

For other funding agencies with similar open-access requirements, indicate the source of funding and notify the editorial office of this requirement in a statement on the Title page of the submitted manuscript.

Conflict of Interest disclosure statement: Include a statement disclosing any potential financial conflicts of interest (or none) for all of the authors.

List of Abbreviations and Other Footnotes

All nonstandard abbreviations should be grouped in alphabetical order into one footnote, with all footnotes placed on a separate page of the manuscript following the acknowledgments. Footnotes in the text should be denoted with a superscript Arabic numeral.

References

Number references consecutively in the order in which they are mentioned in the text. Identify references in text, tables, and figure legends by superscript numerals. References cited only in tables or figure legends should be numbered last. Use the style of the following examples, which are based with slight modification on the formats set forth in 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals,' (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the list of Journals Indexed for MEDLINE, as found in PubMed, posted by the US National Library of Medicine.

List all authors and/or editors up to 7; if more than 7, list the first 6 followed by “et al.” Include the first and last page of each reference.

'Unpublished observations' and 'personal communications' may not be used as references but should be inserted in parentheses in the text.

Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add 'In press.' Examples of correct reference styles are given below:

Articles in Journals

Standard Journal Article - List all authors:

Whitby DJ, Ferguson MW. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol* 1991;147:207-15.

Organization as Author:

The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.

No Author Given:

Coffee drinking and cancer of the pancreas [editorial]. *BMJ* 1981;283:628.

Volume with Supplement:

Magni F, Rossoni G, Berti F. BN-52021 protects guinea pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 1988;20 (5 Suppl):75-8.

Issue with Supplement:

Gardos G, Cole JO, Haskell D, Marby D, Paine SS, Moore P. The natural history of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 1988;8(4 Suppl):31S-37S.

Issue with Part:

Reif S, Terranova VP, EL-Bendary M, Lebenthal E, Petell JK. Modulation of extracellular matrix proteins in rat liver during development. *Hepatology* 1990;12(3 pt 1):519-25.

Article Containing Comment:

Piccoli A, Bossatti A. Early steroid therapy in IgA neuropathy: still an open question [comment]. *Nephron* 1989;51:289-91. Comment on *Nephron* 1989;48:12-7.

Article Comment On:

Kobayashi Y, Fuji K, Hiki Y, Tateno S, Kurokawa A, Kamiyama M. Steroid therapy in IgA nephropathy: a retrospective study in heavy proteinuric cases [see comments]. *Nephron* 1989;51:289-91.

Books and Other Monographs*Personal Author(s):*

Majno GA. *The healing hand: man and wound in the ancient world*. Cambridge: Harvard Univ Press, 1975.

Chapters in a Book:

Philips C, Wenstrup RJ. Biosynthetic and genetic disorders of collagen. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ, editors. *Wound healing: biochemical and clinical aspects*. Philadelphia: Saunders, 1992:152-77.

Conference Proceedings:

Harely NH. Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kaye SV, editors. Indoor air and human health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium; 1984 Oct 19-31; Knoxville (TN) Chelsea (MI): Lewis 1985;6-78.

Unpublished Material:

In press (use only if accepted in book or journal format) McMahon SB, Monroe JG.

Role of primary response genes in generating cellular responses to growth factors.

FASEB J. In press.

Tables

Type each table double-spaced on a separate page. DO NOT submit tables as photographs or digital images (pdf files). Number tables consecutively using Arabic numerals in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all nonstandard abbreviations that are used in each table. DO NOT use internal horizontal and vertical rules. The use of too many tables in relation to the length of the text can produce difficulties in the page layout. The Editor may recommend removal or modification of tables if the page layout is untenable. If the table has been published previously, written permission must be obtained and appropriate acknowledgment must be made. Large data tables may be included as supporting information and referenced in the text as being available online (the author(s) should coordinate this with the managing editor).

Figure Legends

Type figures captions double-spaced starting on a separate page following the tables, with Arabic numerals corresponding to the illustrations. Explain each symbol used in

the illustration, such as arrows, and other visual aids. Scale bars should be labeled within the image, but original magnification may also be stated in the legend.

Units of Measurement

Measurements of length, height, weight, and volume must be reported in metric units or their decimal multipliers. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressures in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI).

Figures

All figures must be either professionally drawn and photographed or produced with appropriate computer graphics. All figures must be submitted electronically according to the specifications outlined below. Failure to submit images according to these specifications will result in reproductions that are small and illegible or in images that are declined. Figures should be submitted in TIFF (min 300dpi resolution), EPS (vector graphics), PDF (with fonts embedded), PPT/PPTX, DOC/DOCX, or AI format

Color photographs should be saved in CMYK at 600 dpi at 5 inches in width. Black and white photographs should be saved in greyscale at 600 dpi at 5 inches in width. New line drawings should be prepared in Microsoft Word, PowerPoint, or Illustrator without embedded images from other sources. Existing line drawings should be scanned at 1200 dpi at a minimum of 5 in in width and saved as EPS files (flow charts must not exceed 7 inches in width). All lettering should be done professionally and be of adequate size to retain clarity after reduction (final letter size in print is 1.5mm high or larger). It is understood that figures will be reproduced at a width of one column (approx. 5 inches), two columns (approx. 10 inches). All figures must be referred to specifically in the text, and numbered in order of appearance in the text. Graphs should be labeled with font size that will be legible in published format; groups or categories should be indicated within the graph whenever possible and error bars and statistical differences included where appropriate. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at

http://authorservices.wiley.com/prep_illust.asp.

Photomicrographs should include a scale bar embedded in the image. For multiple panels of the same magnification in one figure, only the first panel needs to have a scale bar.

If photographs of persons are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph.

The manipulation of photographs by computer or other means may include a vast array of changes. These include addition of text or graphics, change of color, brightness, or contrast: enlargement; or other changes to image quality. Processes that destroy photographs in order to deceive an audience represent unethical manipulation. Distortion of photographs may be achieved by over or under exposure of the film at the time of photography or through computer manipulation. The WHS considers the manipulation of photographs used in presentation to patients, the media, in journals, or at scientific meetings for the purpose of deceiving the audience to be against the ethical standards of the Society.

Figures should be numbered using Arabic numerals consecutively according to the order in which they are cited in the text. If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce the material.

Wound Repair and Regeneration will publish illustrations in color. However, the authors are responsible for all publication costs associated with color reproduction. **Color charges are \$800.00 per page; there is a discounted rate of \$600.00 per page** for WHS, ETRS and JSWH members (to receive discount, corresponding author must be an active member of the Wound Healing Society, excluding students and trainees). Figures should not be submitted in color if authors do not wish to pay for the color cost. NOTE: If color is "informative" and information conveyed through the use of color will not translate into gray scale, the figure will require color publication in print with associated color page charges. Color figures intended for gray scale print publication should not have color descriptors in the figure legends.

Copyright Release Form

After the paper is accepted, the Corresponding Author will receive an email prompting him or her to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) he or she will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agrément

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

For authors choosing OnlineOpen

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements.

For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>

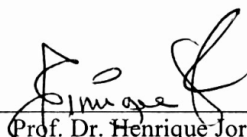


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
Comitê de Ética no Uso dos Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E CITOTÓXICO DA RESINA, EXTRATO E FRAÇÕES DA ESPÉCIE *Hymenaea courbaril I* (Jatobá) SOBRE LESÕES TECIDUAIS E CÉLULAS TUMORAIS**”, registrada com o número de processo **23107.015414/2016-16** e número de protocolo **23/2016**, sob responsabilidade de Ruth Silva Lima da Costa – que envolve a produção manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – UFAC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE, em reunião de **27/10/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/10/2016 até 02/04/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongos <i>Mus musculus/Swiss</i>
Nº de animais	Nº 64
Peso/Idade	Peso: 18 a 22 Gr Idade: 40 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Universidade Federal do Acre


 Prof. Dr. Henrique Jorge de Freitas
 Coordenador CEUA/UFAC
 Portaria nº670 de 06 de março de 2015

Manuscript under review - CONFIDENTIAL

**WOUND REPAIR
AND
REGENERATION**

Antioxidant effect of *Hymenaeacourbaril* L. (Jatobá) sap on the healing of wounds on mice

Journal:	<i>Wound Repair and Regeneration</i>
Manuscript ID	WRR-18-08-0240
Manuscript Type:	Original Research-Basic Science
Date Submitted by the Author:	26-Aug-2018
Complete List of Authors:	<p>Costa, Ruth silva lima; Universidade Federal do Acre, Pro reitoria de pesquisa e pos-graduação; Uniao Educacional do Norte, Curso de Graduação em Enfermagem</p> <p>Martins, David; Universidade Federal do Acre Curso de Medicina, Post- Graduate Program in Health Sciences on the West Amazon</p> <p>Peixoto, Laan Diego; Universidade Federal do Acre, Post-Graduate Program in Health Sciences on the West Amazon</p> <p>Seelaender , Marilia Cerqueira ; Universidade de Sao Paulo Instituto de CienciasBiomedicas, Department of Cellular and Development Biology of the Biomedical Sciences Institute of USP – ICB</p> <p>Da Silva, Bárbara Janaína; Universidade Federal do Amazonas, SchoolofPharmaceuticalSciences</p> <p>Borges, Larissa; Universidade Federal do Amazonas, SchoolofPharmaceuticalSciences</p> <p>Lma, Emerson; Universidade Federal do Amazonas, SchoolofPharmaceuticalSciences</p> <p>Koolen, Héctor ; Universidade Estadual do Amazonas, Master´sProgram in Biotechnology</p> <p>Pessoa, Ana Flavia; Univversity of São Paulo, Department of Cell and Developmental Biology</p> <p>Silva, Romeu Paulo; Universidade Federal do Acre, Program in Health Sciences on the West Amazon</p>
Key Words:	Hymenaeacourbaril L, antioxidant, wound.

SCHOLARONE™
Manuscripts

WoundRepairandRegeneration